

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Ф. Коэн

Регуляция ферментативной активности



«Мир»

CONTROL OF ENZYME ACTIVITY

Philip Cohen

**Professor, Department of Biochemistry
University of Dundee**

Second Edition

**CHAPMAN AND HALL
LONDON AND NEW YORK**

Ф. Коэн Регуляция ферментативной активности

Перевод с английского
д-ра хим. наук Л. М. Гиномана



Москва «Мир» 1986

ББК 28.072
К76
УДК 577.15/17

Коэн Ф.

К76 Регуляция ферментативной активности: Пер. с англ. — М.: Мир., 1986. — 144 с., ил.

В книге известного английского биохимика с современных позиций, четко и сжато описаны основные механизмы регуляции действия ферментов. Книга может служить учебным пособием при изучении вопросов регуляции метаболизма, молекулярных аспектов действия гормонов и лекарств, энзимологии.

Предназначена для биохимиков, физиологов, фармакологов и микробиологов, для студентов и преподавателей медицинских и биологических вузов.

2007020000—132 144—86, ч. 1
041(01)—86

ББК 28.072
57.04

Редакция литературы по биологии

Филип Коэн

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ

Научные редакторы: Н. Н. Шафрановская, М. Р. Погосбекова. Мл. научн. редактор З. В. Соллертинская. Художник А. В. Лисицын. Художественный редактор А. Л. Мусин. Технический редактор Л. В. Рыбалко. Корректор Н. А. Гирия.

ИБ № 5611

Сдано в набор 31.05.85. Подписано к печати 15.11.85. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага кн. жури. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 2,25 бум. л. Усл. печ. л. 7,56. Усл. кр.-отт. 7,77. Уч.-изд. л. 7,28. Изд № 4/4120. Тираж 5500 экз. Зак. 444. Цена 95 коп. ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

© 1983 Ph. Cohen
This book was originally published in
the English language by Chapman and
Hall Limited of London
© перевод на русский язык, «Мир», 1986

В развитии энзимологии, этой бурно развивающейся отрасли биохимии, можно отметить несколько этапов. В первых работах основное внимание исследователей было сосредоточено на методах выделения ферментов, определении их специфичности и кинетики действия. Применение рентгеноструктурных методов послужило основой для изучения структуры и механизма действия ферментов и ознаменовало новый этап в развитии этого направления в биохимии. В последние годы самое большое внимание уделяется проблеме регуляции активности ферментов. Ей и посвящена небольшая по объему книга известного английского биохимика Ф. Козна, рассматривающая один из сложнейших аспектов энзимологии — регуляторный. Известно, что высокая степень координации метаболических процессов, их согласованные изменения в ответ на сигналы, поступающие из окружающей среды, — все это достигается в результате эффективной регуляции активности ферментов, занимающих ключевые позиции на путях метаболизма. Именно ключевые ферменты определяют скорость последовательных реакций в цепи, и именно эти ферменты представляют поэтому особый интерес как мишени для физиологически активных веществ и лекарственных агентов.

Автор выделяет два основных типа регуляции: аллостерическую (нековалентную) и ковалентную модификацию. Наиболее важным случаем регуляции первого типа является ингибирование биосинтеза конечным продуктом. Ковалентная модификация может осуществляться в результате различных реакций: фосфорилирования, аденилирования, уридилирования, ацетилирования, ADP—рибозилирования, тиол — дисульфидного превращения. Эти процессы модифи-

кации могут быть обращены в результате протекания другой реакции, например реакции гидролиза, приводящей к уходу модифицирующей группы. Большое внимание в книге уделено роли ограниченного протеолиза в процессах регуляции ферментов. Изменение активности, обусловленное этой реакцией, необратимо.

Процессы регуляции рассмотрены в книге на различных уровнях. Регуляция метаболических путей показана на примере аллостерического ингибирования биосинтеза аминокислот и нуклеотидов в бактериях. Сложность процессов регуляции активности ферментов убедительно продемонстрирована на примере глутаминсинтетазы из *E. coli*. Анализируя структуру этого фермента и факторы его регуляции, автор показывает, что активность глутаминсинтетазы зависит от суммарного действия многих эффектов, а число возможных модифицированных форм составляет 382!

На конкретных примерах автор анализирует регуляцию клеточного метаболизма под действием нервных стимулов, гормонов и токсинов.

Несомненным достоинством книги является подчеркнуто физиологический подход к проблеме регуляции ферментативной активности. Книга отражает современный уровень исследований. Она может быть полезна для энзимологов, а также тех биохимиков, физиологов, фармакологов и микробиологов, которые специализируются в области исследования регуляции метаболизма, молекулярного действия гормонов и регуляции функции клетки.

Л. М. Гинопман

1. Введение

«Главная задача при изучении регуляции активности ферментов в клетках или тканях заключается в том, чтобы понять механизмы, которые связывают процессы метаболизма с функциональной активностью» [1].

Карты метаболических путей, которыми увешаны стены биохимических лабораторий, дают представление о том, как велико число ферментативных реакций, протекающих в живых клетках. Это характеризует масштаб проблем, с которыми постоянно сталкивается организм при регуляции путей метаболизма; действительно, метаболиты должны поставляться в необходимое в данный момент место в нужном количестве и с наименьшими затратами энергии. В настоящее время ясно, что такая регуляция осуществляется главным образом благодаря наличию особых свойств у ряда ферментов, катализирующих ключевые метаболические реакции.

Очевидно, что скорость образования конечного продукта метаболического пути может регулироваться либо посредством изменения активности фермента, лимитирующего скорость этого пути, либо путем увеличения или уменьшения числа молекул фермента (индукция или репрессия). В этой книге мы рассмотрим только первый путь.

Изучение регуляции ферментов преследует две основные цели:

а) идентифицировать фермент, который катализирует лимитирующую стадию данной цепи реакций при определенном состоянии метаболических процессов;

б) описать механизмы, регулирующие *in vivo* активность лимитирующего фермента, и установить связи данной стадии регуляции с общим метаболизмом клетки.

В настоящей книге основное внимание уделено второй из этих задач. Методы, которые используются для идентификации лимитирующих скорость ферментов, описаны в книге [2].

Вопрос о регуляции активности ферментов связан с различными разделами биохимии. Мы предполагаем, что читатель знаком со схемами основных путей метаболизма и имеет представление о важнейших концепциях в области химии белков и кинетики действия ферментов. В нашей книге рассматриваются ферменты, относящиеся к различным системам организма. Мы попытались описать механизмы регуляции в этих системах достаточно подробно, отметив ограничения, обусловленные возможностями используемых в настоящее время методов, и указав вероятные пути дальнейших исследований. По-видимому, первое впечатление, которое возникнет после ознакомления с материалом книги, — это большое разнообразие механизмов, используемых организмами для регуляции активности ферментов.

Можно думать, что за время, прошедшее от написания книги до выхода ее в свет, сформируется ряд новых направлений; краткое заключение в конце каждой главы поможет читателю суммировать сведения, характеризующие общее состояние проблемы.

Литература

1. *Helmreich E., Cori C. F.* Adv. Enz. Reg., 3, 91—107 (1966).
2. *Denton R. M., Pogson C. I.* Metabolic Regulation, Chapman and Hall, London, 1976.

2. Регуляция биосинтеза аминокислот и нуклеотидов у бактерий путем ингибирования конечным продуктом

На минимальной ростовой среде, содержащей углерод, водород, азот, кислород и серу, бактерии, например *E. coli*, синтезируют большое число различных метаболитов, включая все 20 аминокислот, необходимых для образования белков, и полный набор нуклеотидов для синтеза РНК и ДНК. В то же время у высших организмов, например у млекопитающих, некоторые важные ферменты отсутствуют, и вследствие этого многие соединения оказываются незаменимыми компонентами пищи. Можно полагать, что необычайная разветвленность метаболических путей у бактерий обусловлена необходимостью использования больших количеств углерода, азота и энергии для синтеза не только всех аминокислот и нуклеотидов, но также и ферментов, катализирующих их образование (только в биосинтезе аминокислот число их превышает 100). Неудивительно поэтому, что в середине 50-х годов, после того как были раскрыты основные метаболические пути, свое главное внимание исследователи сосредоточили на механизмах регуляции метаболизма — на том, как именно обеспечивается наиболее эффективное использование доступных питательных веществ. Первые сведения о механизмах регуляции активности ферментов были получены в ходе экспериментов, проводившихся главным образом с целью выяснения последовательности стадий в определенных метаболических путях.

В одной из серий таких экспериментов [1] культуру *E. coli*, растущую экспоненциально на глюкозо-солевой среде, центрифугировали, а осадок ресуспендировали в той же среде, но при этом немеченую глюкозу заменили радиоактивной ^{14}C -глюкозой. Инкубацию продолжили еще час, в течение которого число бактерий

примерно удвоилось. В условиях логарифмического роста бактерии активно синтезировали белок и содержали полный набор ферментов для синтеза всех аминокислот. При анализе суммарного бактериального белка было установлено, что радиоактивности отдельных аминокислот, как и следовало ожидать, пропорциональны их относительному содержанию в препарате белка. Если же, однако, в культуральную среду добавляли немеченую аминокислоту, например L-изолейцин, то включение радиоактивной метки в остатки изолейцина снижалось более чем на 95%; аналогичные опыты были проведены и с другими аминокислотами. Эти эксперименты показали, что в процессе роста бактерии преимущественно использовали добавленные аминокислоты и что эти аминокислоты каким-то образом оказывают ингибирующее действие на свой собственный синтез из молекул-предшественников.

2.1. Регуляция биосинтеза L-изолейцина

Путь биосинтеза L-изолейцина показан на рис. 2.1; на этом же рисунке приведена схема пути синтеза структурно сходной аминокислоты — L-валина. Описанный выше эксперимент показал, что присутствие L-изолейцина в ростовой среде тормозит внутриклеточный синтез этой аминокислоты. В дальнейшем было установлено, что количество L-треонина, обеспечивающее оптимальную скорость роста бактериального мутанта, не способного синтезировать данную аминокислоту, уменьшается при добавлении к среде изолейцина [3]. Этот факт свидетельствует не только о том, что L-треонин необходим для биосинтеза L-изолейцина, но также и о том, что L-изолейцин каким-то образом снижает активность одного или нескольких ферментов, которые катализируют превращение L-треонина в L-изолейцин. Поскольку в приведенной последовательности (рис. 2.1) первая стадия, катализируемая треониндеаминазой, является необратимой, действие L-изолейцина нельзя объяснить просто обращением

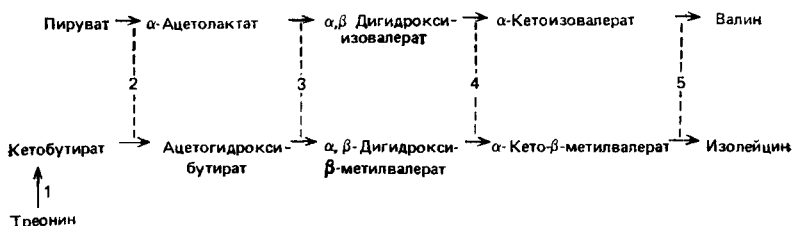


Рис. 2.1. Биосинтетические пути образования L-изолейцина и L-валина. Ферменты: 1 — треониндезаминаза; 2 — синтетаза ацетогидроксикислот; 3 — изомероредуктаза ацетогидроксикислот; 4 — дегидраза дигидроксикислот; 5 — трансаминаза В и (только для валинового пути) валин-аланин-амнобутират—трансаминаза [2].

направления процесса, т. е. образованием L-треонина из L-изолейцина.

Открытие ингибирования треониндезаминазы L-изолейцином *in vitro* [4] послужило важной вехой на пути выяснения механизмов регуляции активности ферментов. Ингибирование является высокоспецифичным, например L-лейцин менее эффективен как ингибитор в 100 раз, а L-валин и D-изолейцин вообще не обладают ингибирующим действием. Более того, ни один из других ферментов рассматриваемой цепи не ингибируется *in vitro* L-изолейцином. Эти данные позволяют сформулировать простой механизм, который объясняет, каким образом L-изолейцин и другие аминокислоты оказываются способными регулировать свой собственный биосинтез без дополнительных энергетических затрат. Согласно этому механизму, в интактной клетке при повышении концентрации L-изолейцина происходит ингибирование треониндезаминазы — первого фермента цепи реакций; это приводит к уменьшению скорости всех реакций рассматриваемого пути и к снижению биосинтеза L-изолейцина. Наоборот, при понижении концентрации L-изолейцина его образование из L-треонина автоматически ускоряется, поскольку эффект ингибирования полностью обратим.

Ингибирование треониндезаминазы L-изолейцином является конкурентным в том отношении, что в при-

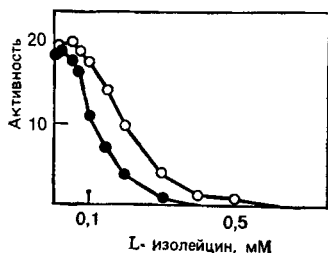


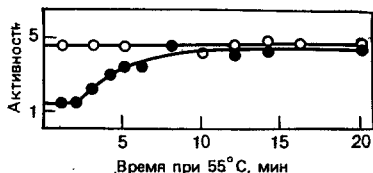
Рис. 2.2. Влияние L-изолейцина на активность L-треониндезаминазы в экстракте *E. coli* K12. Опытные пробы содержали 0,02 М (●) или 0,04 М (○) L-треонина [5].

существовании L-изолейцина концентрация L-треонина, необходимая для достижения полумаксимальной скорости, повышается. Однако кинетика этого процесса сложная: зависимость начальной скорости деаминации L-треонина от его концентрации (в отсутствие L-изолейцина) описывается не гиперболой, а S-образной кривой [5]. Сходный вид имеет график зависимости скорости деаминации L-треонина от концентрации L-изолейцина (при постоянной концентрации L-треонина) (рис. 2.2): заметное ингибирование наблюдается лишь после того, как уровень L-изолейцина превысит определенный порог. Вопрос о том, чем обусловлена столь необычная кинетика, рассматривается в гл. 6; отметим, однако, что при такой зависимости скорости от концентрации конечного продукта, такая, как показана на рис. 2.2, активность фермента в определенной области концентрации L-изолейцина будет меняться более резко, чем в случае функционирования фермента в соответствии с простой кинетикой Михаэлиса — Ментен. Сложная кинетика действия треониндезаминазы, наблюдаемая *in vitro*, может иметь важное физиологическое значение, поскольку она обеспечивает более эффективную регуляцию скорости функционирования данного пути в ответ на изменение концентраций L-треонина и L-изолейцина.

2.2. Утрата чувствительности треониндезаминазы к L-изолейцину; аллостерическая теория

При нагревании треониндезаминаза становится нечувствительной к ингибирующему действию L-изолей-

Рис. 2.3. Десенситизация треониндезаминазы при нагревании. Концентрация L-треонина 0,02 М; опыты проводили в присутствии (●) или в отсутствие (○) 0,01 М L-изолейцина [5].



цина; при этом ее активность в отсутствие данной аминокислоты не меняется (рис. 2.3), т. е. обнаруживается эффект десенситизации. Этот важный факт означает, что L-изолейцин и L-треонин связываются с разными участками фермента и, следовательно, L-изолейцин влияет на связывание L-треонина опосредованно.

Моно, Шанжэ и Жакоб в классическом обзоре [6] при рассмотрении свойств треониндезаминазы и других ферментов, участвующих в регуляции метаболизма, ввели термин *аллостерический эффектор* для регуляторной молекулы (например, L-изолейцина), которая ингибирует (или активирует) определенный фермент. Суть концепции авторов отражена в приводимой ниже цитате из их обзора. «Аллостерический эффектор специфически и обратимо связывается с *аллостерическим участком* фермента. Образование такого комплекса не сопровождается никакой реакцией, в которой участвовал бы сам эффектор, но приводит к скачкообразному обратимому изменению молекулярной структуры белка, т. е. к *аллостерическому переходу*, при котором изменяются свойства активного центра; в результате один (или несколько) кинетических параметров, характеризующих активность фермента, также изменяется. Абсолютно необходимое, хотя и «отрицательное» положение, предусматриваемое данной концепцией, состоит в том, что аллостерический эффектор не должен иметь какого-либо определенного химического или «метаболического» отношения к самому субстрату, поскольку эффектор связывается с участком вне активного центра и не участвует в катализируемой реакции. Вот почему специфичность и конкретное проявление любого аллостерического эффекта обусловлены исключительно структурой самой

белковой молекулы, благодаря которой она может претерпевать определенные дискретные конформационные изменения, запускаемые связыванием аллостерического эффектора. Отсутствие какого-либо «внутреннего» химического сходства или химического взаимодействия между субстратом и аллостерическим эффектором является фактом большого биологического значения».

2.3. Регуляция активности L-треониндезаминазы *in vivo*

Специфическое ингибирование L-треониндезаминазы L-изолейцином, наблюдаемое *in vitro*, позволило предположить (хотя и не доказывая), что именно таким путем L-изолейцин, добавленный в ростовую среду, предотвращает собственный биосинтез. Наиболее убедительные данные о важности этого эффекта *in vivo* были получены при изучении поведения бактериальных мутантов, у которых треониндезаминаза потеряла чувствительность к ингибированию L-изолейцином. У таких бактерий происходит избыточное образование L-изолейцина, и эта аминокислота в большом количестве выделяется в культуральную жидкость [7].

L-валин не ингибирует треониндезаминазу; более того, было показано, что при низких концентрациях L-треонина он активизирует этот фермент [7, 8], устраняя сигмоидную зависимость активности фермента от концентрации L-треонина (рис. 2.4). Значение этого эффекта становится понятным, если обратиться к

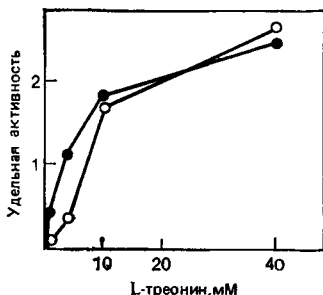


Рис. 2.4. Активность треониндезаминазы как функция концентрации треонина в присутствии (●) или в отсутствие (○) 5,0 мМ L-валина [8].

рис. 2.1, из которого видно, что пути биосинтеза L-изолейцина и L-валина тесно связаны: три фермента у этих путей общие. Следовательно, активация треониндеаминазы L-валином может усилить биосинтез L-изолейцина, когда количество L-треонина ограничено; таким образом, биосинтез L-валина и L-изолейцина может регулироваться одновременно. Однако стимулирует ли L-валин параллельный путь биосинтеза *in vivo*, пока не ясно.

2.4. Регуляция биосинтеза L-лизина, L-метионина, L-треонина и L-изолейцина

Как видно из рис. 2.5, путь биосинтеза L-изолейцина из L-треонина относительно прост. Выше этот путь рассматривался как независимый, на самом же деле он представляет собой ветвь более сложного пути, который приводит к синтезу четырех аминокислот: L-лизина, L-метионина, L-треонина и L-изолейцина из общего предшественника — L-аспарагиновой кислоты. Это существенно усложняет регуляцию метаболических процессов. Так, если фермент, функционирующий на первой стадии пути (в данном случае аспартаткиназа), эффективно ингибируется одной из четырех аминокислот, являющихся конечными продуктами, то поступление промежуточных соединений для синтеза



Рис. 2.5. Биосинтез L-лизина, L-метионина, L-треонина и L-изолейцина из L-аспарагиновой кислоты. Ингибирование конечным продуктом показано пунктирными линиями. Несколько параллельных стрелок указывает на функционирование изоферментов. 1 — аспартаткиназа; 2 — дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты; 3 — гомосериндегидрогеназа; 4 — гомосеринкиназа; 5 — синтетаза дигидропиридоксальной кислоты; 6 — синтетаза сукцинилгомосерина; 7 — треониндеаминаза.

трех других аминокислот также уменьшается; это создает большие трудности для бактерии. Следовательно, сама структура пути указывает на необходимость более сложного механизма регуляции.

2.5. Изоферменты аспартаткиназы у *E. coli* K12, обладающие различными регуляторными свойствами

Эксперимент, аналогичный описанному выше для треониндезаминазы, показал, что только L-лизин и L-треонин ингибируют активность аспартаткиназы в бактериальных экстрактах. Ингибирующий эффект каждой из этих аминокислот в отдельности не превышает 40—50%, однако эффекты ингибирования аддитивны и при избытке обеих аминокислот наблюдается практически полное ингибирование (рис. 2.6). Это неожиданное явление получило объяснение, когда с помощью стандартных методов очистки белка были выделены два компонента аспартаткиназы. Первый компонент фермента полностью ингибируется L-треонином, но не изменяет активности в присутствии L-лизина; второй же компонент полностью ингибируется именно L-лизином и не изменяет активности в присутствии L-треонина [9]. Вследствие этого избыток L-лизина должен снизить образование аспартилфосфата, однако не настолько, чтобы полностью прекратился синтез L-треонина; соответствующая картина будет наблюдаться и при избытке L-треонина (т. е. синтез L-лизина полностью не прекратится). Однако, для

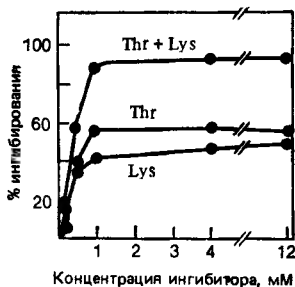


Рис. 2.6. Влияние L-треонина и L-лизина на активность аспартаткиназы в экстракте *E. coli* K12 [9].

того чтобы такая регуляция была эффективной, очевидно, необходимы дополнительные регулирующие механизмы, которые при избытке L-лизина направляли бы уменьшенное количество аспаратилфосфата на образование L-треонина, а при избытке этой аминокислоты — на образование L-лизина. И действительно, соответствующие исследования привели к обнаружению таких звеньев регуляции. Оказалось, что первый фермент на метаболической ветви, ведущей к L-лизу, — синтетаза дигидропиридоксина — специфически ингибируется L-лизином [10], а первый фермент на пути, ведущем к L-треонину, — гомосериндегидрогеназа — специфически ингибируется L-треонином [11]. Два этих вторичных «контрольных пункта» должны направить уменьшенное количество аспаратилфосфата на образование либо L-лизина, либо L-треонина в зависимости от того, какое из этих соединений имеется в избытке. В то же время гомосерин является промежуточным продуктом на пути биосинтеза как L-метионина, так и L-треонина (рис. 2.5). Если бы имелась только одна гомосериндегидрогеназа, полностью ингибируемая избытком L-треонина, то в этих условиях оказался бы также полностью подавленным и синтез L-метионина; очевидно, что необходим еще один регуляторный механизм. И действительно, у *E. coli* K12 были открыты третья аспараткиназа и вторая гомосериндегидрогеназа. Эти ферменты не ингибируются L-лизином, L-треонином и L-метионином, и в то же время L-метионин репрессирует их синтез. Указанные ферменты удалось обнаружить в опытах с мутантами, которые не способны к синтезу метионина в условиях его пониженного содержания в среде; это обеспечивало дерепрессию ферментов [12]. Благодаря наличию дополнительных ферментов биосинтез L-метионина может иметь место в условиях высокой концентрации обеих аминокислот — L-лизина и L-треонина.

Наличие двух гомосериндегидрогеназ предполагает также существование еще одного механизма регуляции, благодаря которому при избытке L-треонина присутствующий в уменьшенном количестве гомосерин направляется на образование L-метионина, а при из-

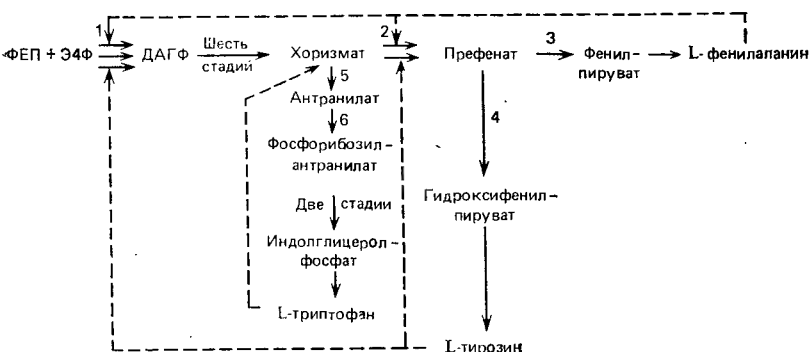


Рис. 2.7. Биосинтез ароматических аминокислот. Ингибирование конечным продуктом показано пунктирными линиями. Параллельные стрелки указывают на функционирование изоферментов. 1 — 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфат (ДАГФ)-синтетаза; 2 — хоризматмутаза; 3 — префенатдегидратаза; 4 — префенатдегидрогеназа; 5 — антранилатсинтетаза; 6 — антранилат-5-фосфорибозилпирофосфат (ФРПФ) — фосфорибозилтрансфераза. ФЭП — фосфоенолпируват; Э4Ф — эритрозо-4-фосфат.

бытке L-метионина гомосерин поступает на синтез L-треонина. Это достигается, вероятно, путем ингибирования гомосеринкиназы L-треонином [13] и О-сукцинилгомосерин—синтетазы L-метионином [14]; наличие такого ингибирования было показано *in vitro*.

Важность некоторых (но не всех) рассмотренных выше регуляторных механизмов была продемонстрирована на бактериальных мутантах; во всех случаях опыты проводились по типу, уже описанному для треониндезаминазы (разд. 2.3).

У *E. coli* из общего предшественника 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфата (ДАГФ) синтезируются три ароматические аминокислоты; этот биосинтетический процесс схематически изображен на рис. 2.7. Охарактеризованы три ДАГФ-синтетазы, одну из которых ингибирует L-фенилаланин, вторую — L-тирозин, третья же синтетаза по типу обратной связи не ингибируется, но синтез ее репрессируется L-триптофаном [15]. После ответвления пути биосинтеза триптофана функционируют две хоризматмутазы,

одну из которых подавляет L-фенилаланин (хоризматмутаза Р), а другую — L-тирозин (хоризматмутаза Т) [16]. Эти примеры показывают, что функционирование двух или более ферментов, катализирующих одну и ту же биохимическую реакцию (*изоферментов*), представляет собой обычный механизм, регулирующий разветвленные метаболические пути у бактерий.

2.6. Бифункциональный фермент аспартаткиназа—гомосериндегидрогеназа; полифункциональные ферменты и полиферментные комплексы

При изучении бактериальных мутантов, которые выделяют большие количества L-треонина в ростовую среду, неожиданно было обнаружено, что оба фермента — треонинчувствительная аспартаткиназа и треонинчувствительная гомосериндегидрогеназа — частично (или полностью) нечувствительны к ингибированию L-треонином [11]. Поскольку одиночная мутация одинаково влияла на обе активности, можно было сделать заключение, что эти ферменты имеют по крайней мере общую полипептидную цепь. Данное предположение согласовывалось с результатами кинетических исследований; было показано, что L-аспартат и АТФ — субстраты аспартаткиназы — ингибируют *in vitro* активность гомосериндегидрогеназы, а NADP и гомосерин — продукты гомосериндегидрогеназной реакции — ингибируют аспартаткиназу. Далее, NADPH — субстрат гомосериндегидрогеназы — защищает от тепловой денатурации ингибируемую треонином аспартаткиназу, но не защищает ту аспартаткиназу, которую ингибирует лизин. Убедительным доказательством того, что обе активности связаны с одним белком, послужили опыты, показавшие, что данные активности не разделяются при фракционировании белков и что конечный продукт очистки является белком гомогенным. Этот белок был назван аспартаткиназа I—гомосериндегидрогеназа I. Он имеет мол. массу

(M_r)¹ 350 000 и состоит из четырех идентичных субъединиц, удерживаемых в комплексе нековалентными связями [17, 18]. Следовательно, обе каталитические активности связаны с одной полипептидной цепью. Аналогичным образом было показано, что активности аспартаткиназы и гомосериндегидрогеназы, репрессируемые при росте на среде, содержащей L-метионин, также принадлежат одному белку, который получил название аспартаткиназа II—гомосериндегидрогеназа II. Ингибируемая лизином аспартаткиназа была названа аспартаткиназой III [11].

При инкубации бифункционального фермента аспартаткиназа I—гомосериндегидрогеназа I с химотрипсином аспартаткиназная активность исчезала, а гомосериндегидрогеназная активность не ингибировалась L-треонином. Фрагмент, обладающий десенситизированной гомосериндегидрогеназной активностью ($M_r=55\,000$), был выделен; методом анализа концевых групп аминокислот показано, что этот фрагмент занимает N-концевую область полипептидной цепи. В литературе описан еще один мутант по аспартаткиназе I—гомосериндегидрогеназе I, который обладал нормальной аспартаткиназной активностью, чувствительной к ингибированию L-треонином, но был лишен гомосериндегидрогеназной активности. Мутантный белок был выделен ($M_r=47\,000$); показано, что он занимает C-концевую область полипептидной цепи. Данная мутация относится к типу *ochre*; укорочение полипептидной цепи обусловлено преждевременной терминацией ее синтеза [19]. Выделение и исследование полипептидных фрагментов показало, что две ферментативные активности присущи разным участкам одной полипептидной цепи (рис. 2.8). Поскольку каждый из фрагментов обладает определенной активностью с неизменной субстратной специфичностью, можно сделать заключение, что полипептидная цепь свернута в два глобулярных домена, каждый из которых в изолированном виде обладает активностью.

¹ M_r — относительная молекулярная масса, *Eur. J. Biochem.*, 144, 1, 1—4 (1981). — *Прим. перев.*

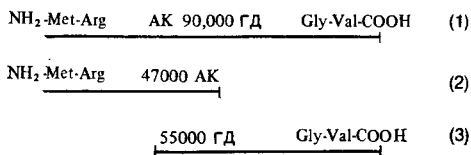


Рис. 2.8. Структура аспараткиназы I — гомосериндегидрогеназы I из *E. coli* K12. 1 — нативный фермент; 2 — N-концевой фрагмент «оснге»-мутанта, обладающий аспараткиназой (AK) активностью; 3 — С-концевой фрагмент из хмотриптического гидролизата, обладающий гомосериндегидрогеназой (ГД) активностью.

В настоящее время идентифицировано большое число бифункциональных ферментов, у которых с одной полипептидной цепью связаны две активности. К числу таких ферментов относятся первые два фермента биосинтеза триптофана у *E. coli* (рис. 2.7) — антранилатсинтетаза и антранилат-(ФРПФ)—фосфорибозилтрансфераза [20]; другие аналогичные примеры приведены в гл. 4 и 5. Более того, были обнаружены *полифункциональные* ферменты, у которых с одной полипептидной цепью связаны не две, а большее число активностей. Такая ситуация, вероятно, чаще встречается у эукариот, чем у прокариот. Например, в клетках млекопитающих первые три фермента биосинтеза пиримидинов — карбамоилфосфатсинтетаза, аспарат-транскарбамоилаза и дигидрооротаза (рис. 2.9) — связаны с одной полипептидной цепью ($M_r = 215\,000$) [21], а у плесени *Neurospora crassa* пять ферментов, катализирующих последовательные реакции синтеза ароматических аминокислот, в ходе которых происходит превращение ДАГФ в 5-енолпирувоилшикимат (рис. 2.7), принадлежат одной полипептидной цепи с $M_r = 165\,000$ [22]. В клетках млекопитающих все семь ферментов, участвующих в синтезе длинноцепочечных жирных кислот из малонил-СоА, входят в состав одного белка с $M_r = 250\,000$ [23].

Отметим, что у *E. coli* ферменты синтеза ароматических аминокислот, пиримидинов и жирных кислот функционируют как автономные единицы. У гриба *Fusarium oxysporum* в синтезе циклического пептидно-

го антибиотика *энниатина* участвуют по крайней мере пять ферментов: все они относятся к одной полипептидной цепи с $M_r = 250\,000$ [24].

Один из путей образования полифункциональных ферментов — слияние генов. Экспериментально его возможность была продемонстрирована в опытах на *S. typhimurium*. Второй и третий гены гистидинового оперона, которые в норме кодируют два различных белка, гистидинолдегидрогеназу и имидазолацетолфосфат-аминотрансферазу, были объединены в результате двух последовательных мутаций со сдвигом рамки в межцистронной зоне; это привело к элиминированию кодона терминации, в норме находящегося между двумя генами, и два фермента стали синтезироваться в составе одного полипептида, который свертывается таким образом, что обе каталитические активности в значительной степени сохраняются [25].

В полифункциональных ферментах, а также в полиферментных комплексах, в которых несколько ферментов взаимодействуют нековалентно, различные активности функционально тесно взаимосвязаны и часто катализируют серии последовательных реакций. Такая ситуация имеет два очевидных преимущества.

1. Последовательные реакции протекают в определенной области клетки, так что продукт каждой реакции оказывается доступным для следующего фермента в значительно большей концентрации, чем в том случае, если бы ферменты были неупорядоченно распределены в клетке.

2. Поскольку промежуточные соединения, не покидая поверхности комплекса, сразу же связываются со следующим ферментом, вероятность того, что это соединение вступит в какую-либо побочную реакцию, сводится к минимуму. Примером может служить хоризматмутазная система биосинтеза ароматических аминокислот (рис. 2.7). Хоризматмутаза Р (ингибируемая фенилаланином) образует комплекс с префенатгидратазой — ферментом, который катализирует образование фенилаланина, в то время как хоризматмутаза Т (ингибируемая тирозином) образует комплекс с префенатдегидрогеназой — ферментом, участвующим в

синтезе тирозина [16]. Таким образом, имеются по существу два пула префената, один из которых предназначен для синтеза фенилаланина, а другой — для синтеза тирозина.

Труднее, к сожалению, проанализировать ситуацию в случае двух бифункциональных аспартаткиназ—гомосериндегидрогеназ, поскольку аспартаткиназа и гомосериндегидрогеназа не следуют функционально непосредственно одна за другой (рис. 2.5). Данные же о том, что второй фермент цепи — дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты (который, по-видимому, представлен одной формой) — связан с бифункциональными ферментами, отсутствуют [11]. В отношении аспартаткиназы I—гомосериндегидрогеназы I необходимо заметить следующее. При слиянии гена аспартаткиназы, чувствительной к ингибированию L-треонином, с геном, кодирующим гомосериндегидрогеназу, для обеспечения взаимодействия между соответствующими глобулярными доменами белка может оказаться достаточным лишь очень небольшое число мутаций; в таком бифункциональном ферменте L-треонин будет координированно ингибировать гомосериндегидрогеназу и аспартаткиназу. Такая «экономия» может давать определенные селективные преимущества [18]. Подобная аргументация не может быть, однако, использована в случае бифункционального фермента аспартаткиназа II — гомосериндегидрогеназа II, который не ингибируется по типу обратной связи. Отметим в заключение, что у всех бифункциональных ферментов участки цепей, которые образуют активные центры, синтезируются в эквимоларных количествах, что представляет собой простой путь координации синтеза ферментов.

2.7. Регуляция аспартаткиназы у различных бактерий: эволюция регуляторных механизмов

У *E. coli* и *Salmonella typhimurium* бифункциональный фермент аспартаткиназа I—гомосериндегидрогеназа I образован одной полипептидной цепью. У других бактерий, например у *Azotobacter* и *Pseudomonas*,

соответствующие ферменты образуются как автономные белки, каждый из которых ингибируется L-треонином. Аспартаткиназа *B. polymyxa* и *B. subtilis* не ингибируется ни L-треонином, ни L-лизинном; в то же время смесь этих аминокислот вызывает почти полное подавление активности (поливалентное ингибирование по типу обратной связи). Аспартаткиназа *Rhodospirillum rubrum* полностью ингибируется L-треонином. В то же время L-метионин и L-изолейцин активируют этот фермент (в отсутствие L-треонина), а L-изолейцин способен эффективно обращать ингибирование, вызываемое L-треонином. Треониндезаминаза *Rhodospirillum rubrum* не ингибируется L-изолейцином, а L-лизин не оказывает действия на активность аспартаткиназы; в такой ситуации увеличение отношения изолейцин/треонин может служить сигналом для ускорения образования общих промежуточных соединений, необходимых для биосинтеза L-лизина и L-метионина [26, 27].

Очевидно, что у рассмотренных выше бактерий регуляция биосинтеза L-лизина, L-метионина, L-треонина и L-изолейцина осуществляется с помощью механизмов, отличных от тех, которые функционируют у *E. coli* K 12. Важное общее правило состоит в том, что хотя стадии метаболических путей у разных организмов неизменны, регуляция этих путей может значительно варьировать не только от организма к организму, но у некоторых млекопитающих от одного типа клеток к другому. Аспартаткиназная система иллюстрирует различные регуляторные механизмы, которые несомненно возникли намного позже, чем сами метаболические пути.

2.8. Регуляция биосинтеза пиримидинов у *E. coli*

Биосинтез УТР и СТР — это еще один метаболический путь, изучение которого сыграло важную роль в развитии представлений о регуляции активности ферментов. Стадии этого пути и главные аллостерические эффекты приведены на рис. 2.9.

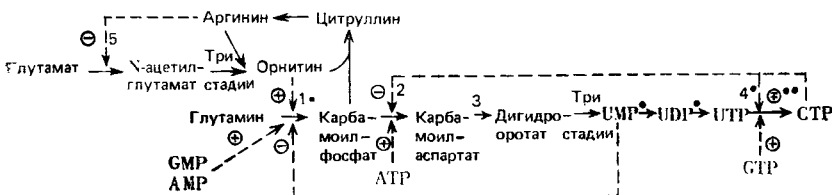


Рис. 2.9. Регуляция биосинтеза пиримидинов у *E. coli*. (+) — аллостерический активатор; (—) — аллостерический ингибитор; ● — реакции, в которых АТФ участвует в качестве субстрата; 1 — карбамоилфосфатсинтетаза; 2 — аспартат-транскарбамоилаза; 3 — дигидрооротаза; 4 — СТР-синтетаза; 5 — N-ацетилглутаматсинтетаза. СТР может функционировать либо как активатор, либо как ингибитор СТР-синтетазы (см. текст).

Результаты одного из первых экспериментов [28], который показал, что аспартат-транскарбамоилаза (АТКза) участвует в регуляции этого пути, представлены на рис. 2.10. В опыте был использован мутант *E. coli*, у которого отсутствовала дигидрооротаза — фермент, следующий за АТКазой (рис. 2.9). Этот мутант осуществлял АТКазную реакцию, но для роста его был необходим урацил. Непосредственно перед тем моментом, когда урацил в ростовой среде должен

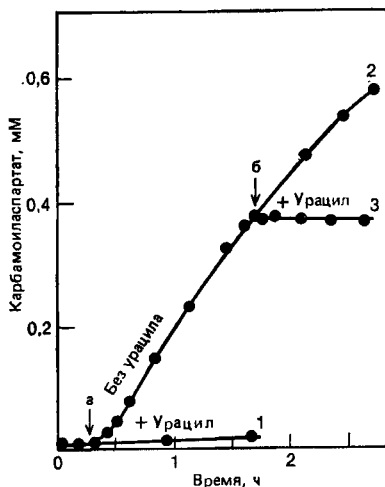


Рис. 2.10. Влияние недостатка урацила на образование карбамоиласпартата у мутанта *E. coli*, не способного синтезировать дигидрооротазу. а — Момент истощения урацила в среде. Непосредственно перед этим моментом к части культуры (1) добавили урацил (0,4 мМ); б — в данный момент урацил (0,4 мМ) внесли в другую часть культуры [28].

был исчерпаться, культуральную жидкость разлили в две пробирки. К одной из них был добавлен избыток урацила, в другой пробирке вследствие исчерпания урацила рост прекратился и начал накапливаться карбамоиласпартат; в течение четырех часов его содержание достигло 50% от сухого веса бактерий. Однако после добавления к этой порции культуры урацила образование карбамоилфосфата очень быстро прекратилось. В первой же пробирке, в которую урацил добавили до его исчезновения из среды, накопления карбамоилфосфата не происходило. Из этого опыта был сделан вывод, что *in vivo* АТКазная активность ингибируется либо урацилом, либо образующимся из него метаболитом. В дальнейшем *in vitro* было обнаружено сильное ингибирующее действие СТР на активность фермента (по типу обратной связи); СМР слабо ингибирует этот фермент, а УТР и UMP вообще не оказывают на него ингибирующего действия [28, 29]. Физиологическое значение ингибирования СТР *in vivo* было показано в экспериментах с мутантом, у которого отсутствовала СТР-синтетаза (рис. 2.9). Этот мутант синтезирует УТР по пиримидиновому пути, но для синтеза СТР ему необходим экзогенный цитидин. При уменьшении количества цитидина в среде содержание внутриклеточного УТР увеличивается в 10 раз и уридин выделяется в ростовую среду; эти данные показывают, что, несмотря на большие количества УТР, пиримидиновый путь остается нерегулируемым. В присутствии цитидина и, следовательно, СТР продукции избыточного УТР не происходит [30, 31]. АТР активирует АТКазу *in vitro* [28, 29]. График зависимости активности АТказы от концентрации аспартата имеет сигмоидный характер. СТР конкурирует с аспартатом, сдвигая кривую вправо и придавая ей еще более выраженный сигмоидный характер (рис. 2.11). В присутствии АТР кривая сдвигается влево и становится менее сигмоидной: АТР снимает ингибирование, вызванное СТР. Для нормального синтеза РНК четыре нуклеозидтрифосфата — АТР, ГТР, СТР и УТР — должны присутствовать примерно в равных количествах, поэтому при относительно низком

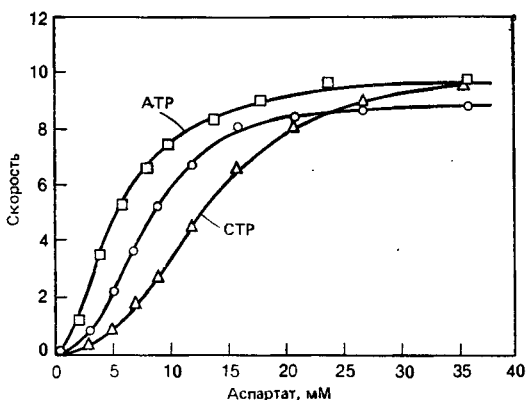


Рис. 2.11. Влияние АТФ и СТР на АТКазиную активность. Скорость определяли при рН 7,0 в отсутствие аллостерических эффекторов (○), а также в присутствии 0,4 мМ СТР (Δ) или 2,0 мМ АТФ (□) [39].

уровне L-аспартата активация АТКазы будет стимулировать синтез УТР и СТР, уравнивая тем самым биосинтез пуринов и пиримидинов. Действие АТФ и СТР на активность АТКазы можно сравнить с действием L-валина и L-изолейцина на активность L-треониндеаминазы (рис. 2.2 и 2.4).

Другие механизмы, обеспечивающие уравнивание образования УТР, СТР, АТФ и GTP, функционируют на уровне СТР-синтетазы (рис. 2.9). Этот фермент аллостерически активируется GTP [32]. СТР в высокой концентрации ингибирует СТР-синтетазу, вероятно, путем конкуренции с ее субстратом УТР. Активирование же фермента с помощью СТР можно наблюдать при низких концентрациях УТР; в этом случае СТР функционирует, вероятно, подобно GTP. АТФ является субстратом СТР-синтетазы, а также трех последующих ферментов пиримидинового пути (рис. 2.9).

Фермент, предшествующий в метаболическом пути АТКазе, — карбамоилфосфат-синтетаза (рис. 2.9) — также регулируется как пуриновыми, так и пиримидиновыми нуклеотидами [33—35]. UMP, UDP и UTP

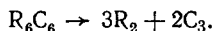
ингибируют его, а пуриновые нуклеотиды — IMP, GMP и AMP — вызывают активацию этого фермента. У *E. coli* карбамоилфосфат участвует в образовании цитруллина из орнитина в цепи реакций биосинтеза L-аргинина (рис. 2.9). При избытке аргинина орнитин не синтезируется, поскольку аргинин ингибирует N-ацетил, L-глутамат—синтетазу и таким образом блокирует первую стадию пути, ведущего к образованию орнитина (рис. 2.9). Итак, наличие в ростовой среде аргинина приводит к тому, что карбамоилфосфат используется только для биосинтеза пиримидинов, и первым ферментом пиримидинового пути становится карбамоилфосфат—синтетаза, а не АТКаза. То обстоятельство, что карбамоилфосфат—синтетаза *in vitro* ингибируется уридиновыми нуклеотидами, и в первую очередь UMP, указывает, что в условиях избытка аргинина первичная регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов осуществляется на стадии, контролируемой именно данным ферментом, а не АТКазой. Если аргинина в среде мало, то концентрация орнитина повышается. Он аллостерически активирует карбамоилфосфат—синтетазу и снимает ингибирование, вызываемое UMP [33, 35]. В этом случае первичную регуляцию пиримидинового биосинтеза осуществляет, по видимому, АТКаза. Описанная ситуация иллюстрирует интересный принцип регуляции метаболизма. Во всех случаях метаболический путь регулируется ферментом, катализирующим лимитирующую стадию, однако в зависимости от метаболического состояния клетки эта стадия может смещаться.

Первоначально представлялось весьма неожиданным, что именно СТР, а не УТР ингибирует АТКазу по принципу обратной связи, поскольку в условиях избытка СТР и ограниченности уридинового пула АТКаза будет ингибирована и не сможет обеспечить клетку УТР. Это приведет к остановке клеточного роста, ибо СТР может использоваться для синтеза РНК лишь в том случае, когда его количество примерно равно количеству УТР [28]. Однако детальный анализ ингибирования АТКазы с помощью СТР показывает, что *in vitro* в условиях избытка карбамоилфос-

фата это ингибирование никогда не превышает 85% [28]. У бактерий с недостатком UMP и UTP создается высокий уровень карбамоилфосфата (карбамоилфосфат—синтетаза не ингибирована) и, несмотря на большой избыток СТР, промежуточные соединения будут использоваться для образования UTP. Данных о наличии второй АТКазы, которая бы не ингибировалась СТР и находилась под контролем уридинового пула, в настоящее время не имеется. Приведенный пример показывает, каким образом количественный анализ действия аллостерического эффектора позволяет выяснить механизм регуляции *in vivo*.

2.9. Структура АТКазы: индивидуальные каталитические и регуляторные субъединицы в одном ферменте

В 1965 г. Герарту и Шахману в эксперименте, ставшем уже классическим [37], удалось осуществить диссоциацию АТКазы (коэффициент седиментации 11,7 S) на два компонента — 5,8 S и 2,8 S. Их изучение показало, что компонент 5,8 S обладает каталитической активностью, но при этом не ингибируется СТР и не способен к активации АТР; у компонента 2,8 S каталитическая активность отсутствует, однако сохраняются связывающие участки для СТР и АТР. После рекомбинации между 2,8 S и 5,8 S чувствительность компонента 5,8 S к ингибированию СТР восстанавливается. В настоящее время установлено, что компонент 5,8 S ($M_r=100\,000$) является *тримером*, состоящим из трех идентичных каталитических (C) субъединиц, а компонент 2,8 S ($M_r=34\,000$) — это *димер*, образованный двумя идентичными регуляторными (R) субъединицами. 11,7 S-АТКаза ($M_r=300\,000$) имеет структуру R_6C_6 и диссоциирует следующим образом [38]:



Трехмерная структура АТКазы была определена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,3 нм; упаковка субъединиц показана на рис. 2.12. Установлено, что для этого фермента характерна сим-

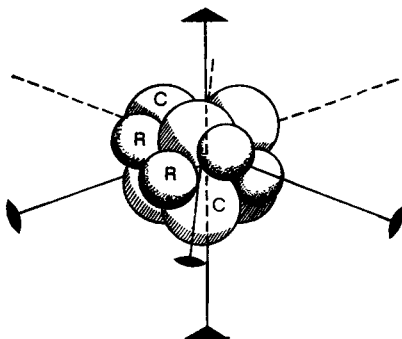


Рис. 2.12. Схема расположения субъединиц в молекуле аспартат-транскарбамоилазы; вид в направлении, перпендикулярном оси симметрии третьего порядка. Показаны также оси второго порядка, проходящие через регуляторные димеры. Каталитические и регуляторные цепи условно показаны в виде сфер. Треугольники, образованные крупными сферами, — каталитические тримеры; небольшие сферы (затененные) — регуляторные димеры.

метрия D_3 . Два C_3 -тримера контактируют между собой, а три R_2 -димера связывают каталитические цепи противостоящих C_3 -тримеров. В зоне контакта между R - и C -субъединицами находятся атомы цинка, которые играют важную роль в их ассоциации [39]. Активные центры и аллостерические участки расположены в разных полипептидных цепях; это однозначно доказывает, что они не тождественны, и служит убедительной иллюстрацией концепции аллостерии. В настоящее время ясно, что активатор фермента АКТаза АТР и его ингибитор СТР связываются с одним и тем же участком в R -субъединице и что этот аллостерический участок находится на расстоянии около 6 нм от ближайшего каталитического центра [39]. Следовательно, влияние АТР и СТР на катализ обусловлено структурными изменениями, которые в нативном ферменте передаются через зоны контактов от R -к C -субъединицам. Следует, однако, отметить, что наличие специальных каталитических и регуляторных субъединиц не является общим правилом. Так, треониндезаминаза, а также аспартаткиназа I—гомосериндегидрогеназа I состоят из четырех идентичных субъеди-

ниц; при этом очевидно, что активный центр и аллостерический участок у этих ферментов расположены в одной полипептидной цепи.

2.10. Заключение

1. Общий механизм регуляции биосинтетических путей у бактерий заключается в ингибировании фермента, катализирующего первую стадию метаболического пути конечным продуктом этого пути по типу обратной связи. Благодаря такому механизму потребность микроорганизмов в углероде, азоте и энергии минимальна, и именно этот механизм обеспечивает координированный ответ всех реакций пути на изменение содержания конечного продукта. Если бы у бактерий осуществлялась регуляция активности фермента, функционирующего не на первой, а на одной из последующих стадий пути, это привело бы к значительному увеличению концентраций промежуточных соединений. Присутствие в каждой клетке большого числа метаболитов несомненно создало бы серьезные проблемы в отношении растворимости. Вот почему регуляция именно первой, пусковой стадии метаболического пути имеет значение и для поддержания относительно низких концентраций метаболитов в клетке.

2. При изучении механизмов регуляции наибольшую информацию дают два типа экспериментов: анализ свойств изолированных ферментов и исследование бактериальных мутантов, у которых отсутствуют определенные ферменты. Именно исследование таких мутантов оказалось решающим при выяснении вопроса о том, функционируют ли *in vivo* регуляторные механизмы, постулированные на основании исследований *in vitro*.

3. Наличие разветвленных метаболических путей и функциональная взаимосвязь между ними предполагают, что наряду с основным типом регуляции — ингибированием конечным продуктом по типу обратной связи — существуют и другие, дополнительные. Эти механизмы, а также структуры регулируемых ими ферментов весьма разнообразны.

Литература

1. *Abelson P. H.* J. Biol. Chem., **206**, 335—343 (1954).
2. *Umbarger H. E.* Curr. Tops. Cell. Reg., **1**, 57—76 (1969).
3. *Umbarger H. E.* In: Amino Acid Metabolism, 442—451 (McElroy and Glass, eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955.
4. *Umbarger H. E.* Science, **123**, 848 (1956).
5. *Changeux J. P.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **26**, 313—318 (1961).
6. *Monod J., Changeux J. P., Jacob F. J.* Mol. Biol., **6**, 306—329 (1963).
7. *Changeux J. P.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **28**, 497—504 (1963).
8. *Freundlich M., Umbarger H. E.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **28**, 505—511 (1963).
9. *Stadtman E. R., Cohen G. N., Le Bras G., Robichon-Szulmasyter H. J.* Biol. Chem., **236**, 2033—2038 (1961).
10. *Yugari Y., Gilvary C.* Biochem. Biophys. Acta, **62**, 612—614 (1962).
11. *Cohen G. N.* Curr. Tops. Cell. Reg., **1**, 183—231 (1969).
12. *Patte J. C., Le Bras G., Cohen G. N.* Biochem. Biophys. Acta, **136**, 245—257 (1967).
13. *Wormser E. H., Pardee A. B.* Arch. Biochem. Biophys., **78**, 416—432 (1958).
14. *Rowbury R. J.* Biochem. J., **82**, 24P (1962).
15. *Brown K. D., Day C. H.* Biochem. Biophys. Acta, **77**, 170—172 (1963).
16. *Cotton R. G. H., Gibson F.* Biochem. Biophys. Acta, **100**, 76—88 (1965).
17. *Cohen G. N., Dautry-Varsat A.* In: Multifunctional Proteins (H. Bisswanger and E. Schmincke-Ott, eds.), John Wiley and Sons Inc., New York, ch. 3, pp. 49—121, 1980.
18. *Katinka M., Cossart P., Sibilli L., Saint-Girons I., Chalvignac M. A., Le Bras G., Cohen G. N., Yaniv M.* Proc. Nat. Acad. Sci (USA), **77**, 5730—5733 (1980).
19. *Veron M., Cohen G. N.* Eur. J. Biochem., **28**, 520—527 (1972).
20. *Truffa-Bachi P., Cohen G. N.* Ann. Rev. Biochem., **42**, 113—134 (1973).
21. *Mally M. I., Grayson D. R., Evans D. R.* Proc. Nat. Acad. Sci (USA), **78**, 6647—6651 (1981).
22. *Lumsden J., Coggins J. R.* Biochem. J., **169**, 441—444 (1978).
23. *McCarthy A. D., Hardie D. G.* Eur. J. Biochem., **130**, 185—193 (1983).
24. *Zocher R., Keller U., Kleinkauf H.* Biochemistry, **21**, 43—48 (1982).
25. *Yournon J., Kohno T., Roth J. R.* Nature, **228**, 820—824 (1970).
26. *Datta P., Gest H.* Nature, **203**, 1259—1261 (1964).
27. *Paulus H., Gray E. J.* Biol. Chem., **239**, 4008—4009 (1964).
28. *Gerhart J. C.* Curr. Tops. Cell. Reg., **2**, 276—325 (1970).
29. *Gerhart J. C., Pardee A. B. J.* Biol. Chem., **237**, 891—896 (1962).
30. *Neuhard J. J.* Bacteriol., **96**, 1519—1527 (1968).

31. O'Donovan G. A., Neuhaud J. Bact. Reviews, **34**, 278—343 (1970).
32. Long C. W., Pardee A. B. J. Biol. Chem., **242**, 4705—4721 (1967).
33. Pierard A. Science, **154**, 1572—1573 (1966).
34. Anderson P. M., Meister A. Biochemistry, **5**, 3164—3169 (1966).
35. Ahmed A., Ingraham J. L. J. Biol. Chem., **244**, 4033—4038 (1969).
36. Vyas S., Maas W. K. Arch. Biochem. Biophys., **100**, 542—546 (1963).
37. Gerhart J. C., Schachman H. K. Biochemistry, **4**, 1054—1062 (1965).
38. Rosenbusch J. P., Weber K. J. Biol. Chem., **246**, 1644—1657 (1971).
39. Kontrowitz E. R., Pastra-Landis S. C., Lipscomb W. N. Trends in Biochemical Sciences, **5**, 124—128 and 150—153 (1980).
40. Atkinson D. E. Current Topics in Cellular Regulation, **1**, 29—43 (1970).

3. Появление биологической активности в результате ограниченного протеолиза

3.1. Активация зимогенов в тонком кишечнике

Концепция регуляции ферментов сформировалась при изучении активации зимогенов поджелудочной железы. Еще в конце прошлого столетия было известно, что свежесвыделенный сок поджелудочной железы начинает переваривать белки лишь после контакта с фактором, присутствующим в тонком кишечнике и названным энтерокиназой. Дальнейшее развитие представлений в этой области можно разделить на два этапа. В 30-е годы благодаря усовершенствованию техники фракционирования белков были охарактеризованы основные этапы процессов активации [1]. В 50-е годы на основе развития более сложных приемов разделения белков и разработки методов определения их первичной и третичной структуры оказался возможным анализ молекулярных механизмов процессов активации.

3.1.1. Панкреатические протеиназы и их специфичность

Активированный сок поджелудочной железы содержит по крайней мере семь разных протеиназ (табл. 3.1). Известны три типа эндопептидаз — трипсины (Т), химотрипсины (ХТ) и эластазы (Э) — и два типа экзопептидаз — карбоксипептидаза А (КпА) и карбоксипептидаза В (КпВ). Эндопептидазы дополняют друг друга по специфичности, их совместное действие приводит к глубокому расщеплению белков пищи, которые ранее частично гидролизуются протеиназами желудка. Экзопептидазы КпА и КпВ катализируют последовательное отщепление аминокислот с С-конца пептидов; при этом КпВ отщепляет С-концевой аргинин или лизин от пептидов, образующихся при

Таблица 3.1. Специфичность панкреатических протеиназ

Протеиназа	Тип	Специ- фичность	Расщепляемые пептидные связи	
Трипсины I и II	Эндопептидаза	Узкая	Lys-X,	Arg-X
Химотрипсины А, В, С	»	Широкая	Tyr-X, Trp-X, His-X	Phe-X, Leu-X,
Эластазы I и II	»	Широкая	Val-X, Gly-X,	Ala-X, Ser-X
Карбоксипептидаза А	Экзопептидаза	Очень широкая	X-Tyr, X-Trp, X-Ile, X-His, X-Val,	X-Phe, X-Leu, X-Met, X-Ala, X-Thr
Карбоксипептидаза В	Экзопептидаза	Узкая	X-Lys,	X-Arg

действии трипсина, а КпА — С-концевые аминокислоты либо от тех пептидов, которые образовались при гидролизе белков химотрипсином и эластазой, либо от триптических пептидов, ранее взаимодействовавших с КпВ. Дальнейшее переваривание осуществляют пептидазы, секретируемые клетками тонкого кишечника. Из них особенно важна пролиндипептидаза, фермент, специфически гидролизующий дипептиды X-Рго [2]; панкреатические протеиназы связи Рго-X и X-Рго не расщепляют. К этой же группе относится классическая «лейцинаминопептидаза», катализирующая последовательное отщепление аминокислот от N-концов пептидов [3].

3.1.2. Секреция и активация панкреатических зимогенов

Все семь протеиназ находятся в поджелудочной железе в виде неактивных предшественников, называемых *зимогенами*: трипсиноген (Тг), химотрипсиногены (ХТг) А, В и С, проэластаза (ПроЭ) и прокарбоксипептидазы А и В (ПроКпА и ПроКпВ). Они локализованы в экзокринных ацинарных клетках внутри

сферических зимогеновых гранул, отделенных мембраной от других компонентов клетки. Секреция в двенадцатиперстную кишку происходит путем *экзоцитоза* — процесса, в ходе которого мембрана зимогенной гранулы сливается с внешней мембраной ацинарной клетки. Этот процесс стимулируется возбуждением ветви вагуса, иннервирующей поджелудочную железу, а также пептидными гормонами — *холецистокинином* и *секретином*. Последние синтезируются в клетках верхней части тонкого кишечника, затем выделяются в кровяное русло и оттуда попадают в поджелудочную железу. Холецистокинин стимулирует секрецию небольшого количества панкреатического сока, богатого предшественниками ферментов. Под действием другого пептидного гормона — *секретина* — панкреатический сок выделяется обильно и содержит большое количество ионов HCO_3^- , но при этом беден зимогенами. Ионы HCO_3^- необходимы для нейтрализации кислого содержимого, поступающего из желудка, так как панкреатические протеиназы имеют довольно острый рН-профиль активности с оптимумом около рН 8,0. Наиболее сильными стимуляторами секреции холецистокинина являются некоторые L-аминокислоты и длинноцепочечные жирные кислоты, а выделение секрета наиболее эффективно стимулируется кислотой [4—6].

Энтеропептидаза (Эп), вначале называвшаяся энтерокиназой, является протеолитическим ферментом, синтезируемым в щеточной каемке эпителия тонкого кишечника. Она запускает процесс активации зимогенов, катализируя превращение трипсиногена в трипсин (рис. 3.1) [1]. На важную роль энтеропептидазы *in vivo* указывает тот факт, что тяжелые нарушения функции кишечника часто коррелируют с отсутствием этого фермента [7]. После образования некоторого количества трипсина превращение трипсиногена в трипсин становится автокаталитическим, так как трипсин катализирует активацию трипсиногена (рис. 3.2).

Трипсин катализирует также активацию проэластазы [8], хомотрипсиногенов [9—11] и ПроКпВ [12].

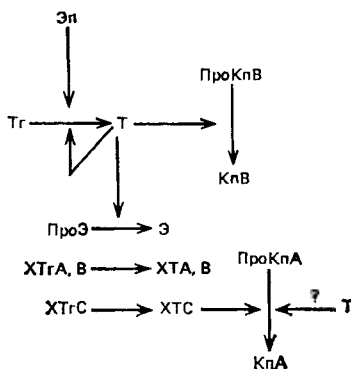


Рис. 3.1. Вероятная последовательность стадий в процессе активации панкреатических зимогенов.

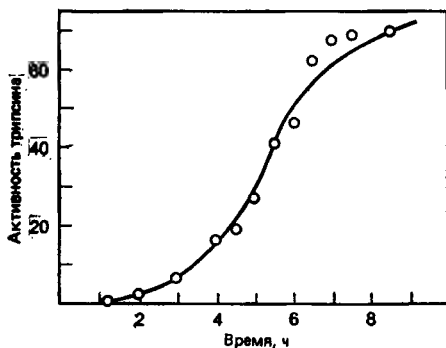


Рис. 3.2. Автокаталитическая активация трипсиногена трипсином. Кружочками обозначены экспериментальные точки. Линия — теоретическая кривая для простой автокаталитической реакции [1].

ПроКпА находится в комплексе с химотрипсиногеном и, вероятно, еще одним зимогеном, названным зимогеном Е. Его механизм активации, вероятно, заключается в образовании химотрипсина С под действием трипсина, после чего химотрипсин активирует ПроКпА [13].

Для активации любого зимогена достаточно расщепления одной пептидной связи (табл. 3.2). Напри-

Таблица 3.2. Активация некоторых паикреатических зимогенов. Пептидные связи, расщепляемые в процессе активации, отмечены стрелками [8, 11, 15, 17]

Зимоген	Активационный пептид
Бычий Тг	Val-Asp-Asp-Asp-Lys $\xrightarrow{\downarrow}$ Ile-Val-
Тг свиньи	Phe-Pro-Thr-Asp-Asp-Asp-Lys—Ile-Val-
Бычий ХТгА	Cys-Gly-Val-Pro-Ala-Ile-Gln-Pro-Val-Leu-Ser-Gly-Leu-Ser-Arg $\xrightarrow{\downarrow}$ Ile-Val-
Бычий ХТгВ	Cys-Gly-Val-Pro-Ala-Ile-Gln-Pro-Val-Leu-Ser-Gly-Leu-Ala-Arg $\xrightarrow{\downarrow}$ Ile-Val-
Бычий ХТгС	Cys-Gly-Ala-Pro-Ile-Phe-Gln-Pro-Asn-Ser ———— Ala-Arg $\xrightarrow{\downarrow}$ Ile-Val-
Крысиная ПроЭII	Cys-Gly-Tyr-Pro-Thr-Tyr-Gln-Val-Gln-His ———— Asp-Val-Ser-Arg $\xrightarrow{\downarrow}$ Val-Val-

мер, энтеропептидаза расщепляет связь Lys 6-Val 7 в молекуле трипсиногена и делает это в 2000 раз быстрее, чем эквивалентное количество трипсина. Вероятно, большая скорость активации энтеропептидазой обусловлена способностью этого фермента «узнавать» необычный участок последовательности (Asp)₄-Lys [14]. В то же время существенное физиологическое значение, по-видимому, имеет именно автокаталитическая активация трипсиногена трипсином, поскольку его в тонком кишечнике значительно больше, чем энтеропептидазы. Показано, что энтеропептидаза не способна активировать какой-либо другой зимоген.

Химотрипсин образуется при расщеплении трипсином связи Arg 15-Ile 16; однако далее автокаталитически под действием химотрипсина происходит расщепление еще нескольких пептидных связей (Leu 13-Ser 14, Tyr 146-Trp 147 и Asp 148-Ala 149), что не сопровождается дальнейшим изменением активности. При этом освобождаются два дипептида — Ser-Arg и Thr-Asp; три образующиеся полипептидные цепи химотрипсина А не диссоциируют, так как они связаны дисульфидными мостиками [9].

Недавно установлена структура активационных пептидов проэластаз I и II из поджелудочной железы крысы путем определения нуклеотидной последовательности кДНК, синтезированной на информационной РНК этих ферментов, как на матрице. Показано, что активационный пептид проэластазы II сходен с соответствующим пептидом химотрипсиногена (табл. 3.2), в то время как активационный пептид проэластазы I значительно от него отличается [15].

При активации ПроКпА химотрипсином С происходит расщепление единственной пептидной связи, и с N-конца уходит пептид, содержащий 94 аминокислотных остатка [16]. Хотя КпВ и КпА по размеру почти одинаковы ($M_r \sim 35\,000$), ПроКпВ ($M_r = 57\,000$) значительно больше, чем ПроКпА; следовательно, при активации первой происходит удаление более крупного фрагмента. Известно, что появление активности КпВ (60—70% от максимальной) обусловлено триптическим расщеплением связи Arg-Thr, в результате кото-

рого размер молекулы существенно не меняется. Максимальная активность достигается лишь при уменьшении M_r до величины = 35 000; этот процесс протекает относительно медленно [12].

Синтез протеиназ в виде зимогенов имеет существенное значение по двум причинам. Во-первых, наличие этого механизма предотвращает расщепление других белков поджелудочной железы; во-вторых, исключается возможность переваривания одного фермента другим внутри гранул, до того как эти ферменты начнут секретироваться. Образование специфических гранул облегчает регуляцию секреции и делает невозможной активацию зимогенов другими протеиназами, находящимися в клетках вне гранул. С панкреатическим соком секретруется также белок, являющийся специфическим ингибитором трипсина [1, 18]. На его долю приходится только 2% белка панкреатического сока, что значительно меньше содержания трипсиногена [19]. Функция данного ингибитора, вероятно, состоит в том, чтобы не допустить автокаталитическую активацию трипсиногена следовыми количествами трипсина, которые могут образоваться в гранулах; благодаря этому активация зимогенов происходит только тогда, когда они встречаются с энтеропептидазой.

Активация панкреатических зимогенов может служить примером усиления первоначального сигнала путем регуляции активности ферментов. Каждая молекула энтеропептидазы превращает большое число молекул трипсиногена в трипсин; в свою очередь каждая молекула трипсина катализирует образование новых молекул трипсина; трипсин активирует другие зимогены, и активированные протеиназы гидролизуют пептидные связи. Другие примеры усиления сигналов будут рассмотрены далее в этой главе и в гл. 4 и 5. То обстоятельство, что участки пептидной цепи, в которых в процессе активации происходит гидролиз, локализованы около N-конца зимогена и что для появления активности необходимо расщепить только одну связь, хорошо иллюстрирует принцип биологической экономии. Нативная конформация зимогена создает

благоприятные условия для расщепления трипсином лишь определенной связи Arg-X или Lys-X, в то время как многие другие, потенциально расщепляемые связи становятся доступными только после денатурации зимогенов.

Не всегда принимается во внимание, что поджелудочная железа человека ежедневно секретирует около 10 граммов гидролитических ферментов; это весьма значительная доля по отношению к количеству белка, поступающему в организм при некоторых рационах [20]. Отсюда следует, что возможность достаточно эффективного взаимного расщепления протеиназ с образованием аминокислот, вновь абсорбируемых в кишечнике, очень важна для организма.

3.1.3. Превращение химотрипсиногена в химотрипсин

Третичная структура химотрипсина и химотрипсиногена установлена с помощью метода рентгеноструктурного анализа (разрешение 0,25 нм) [21, 22]. Необходимым для катализа остатком у химотрипсина является Ser 195. Он образует водородную связь с His 57, который в свою очередь связан с Asp 102 (рис. 3.3). Эта пара водородных связей является системой с переносом заряда; благодаря ей отрицательный заряд

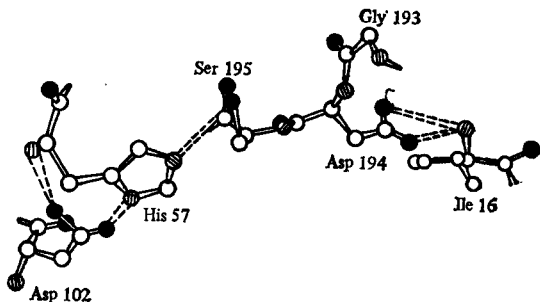


Рис. 3.3. Расположение и конформация некоторых функционально важных аминокислот в активном центре химотрипсина. Вид с поверхности молекулы по направлению к ее внутренней области. ○ — углерод, (||) — азот, ● — кислород [10].

переносится от погруженного в глобулу остатка Asp 102 через гидрофобную область к кислороду серина. Это повышает электроотрицательность атома кислорода, в результате чего обычно инертный гидроксил серина становится сильным нуклеофилом, способным осуществлять нуклеофильную атаку на карбонильный кислород, участвующий в образовании гидролизуемой пептидной связи. То, что Ser 195 важен для катализа, было очевидно до кристаллографических исследований, поскольку известно, что этот остаток легко вступает в реакцию с диизопропилфторфосфатом (ДФФ) с образованием ковалентного производного, лишенного активности. Трипсин, эластаза и энтеропептидаза также инактивируются ДФФ. Значение этого факта обсуждается ниже.

Характер укладки полипептидной цепи химоотрипсина и химоотрипсина очень сходен. Сравнение структуры этих белков показывает, что при активации происходит лишь несколько важных перемещений некоторых участков цепи. Наиболее неожиданным оказалось то обстоятельство, что при превращении зимогена в активный фермент положение Ser 195, His 57 и Asp 102 фактически не меняется [22]. Это согласуется с данными о том, что Ser 195 зимогена обладает повышенной реакционной способностью, однако он значительно медленнее, чем Ser 195 активного фермента, реагирует с ДФФ или с цианатом.

В процессе активации наиболее важны следующие события. Свободная аминокетуппа Ile 16, освобождающаяся при триптическом расщеплении (рис. 3.2), погружается в глубь молекулы, где образует ионную пару с Asp 194 (рис. 3.3). В результате этого боковые цепи Ile 16 и Val 17 также оказываются погруженными в глубь молекулы, что в свою очередь приводит к разрыву имевшейся в зимогене водородной связи между Asp 194 и His 40. Gly 193 образует новую водородную связь с His 40. Arg 145 перемещается с поверхности в глубь молекулы и взаимодействует с карбоксильной группой боковой цепи Asp 194. Met 192 выходит из глубины молекулы на поверхность, на тот ее участок, который в зимогене занимал остаток

Arg 145. Эти изменения обуславливают четыре из девяти структурных особенностей, ответственных за специфичность химотрипсина. Таким образом, зимоген отличается от активного фермента отсутствием четырех «детерминант специфичности», благодаря которым фермент узнает свои полипептидные субстраты. Как показал ориентировочный расчет, именно эти отличия обеспечивают 10^4 — 10^6 -кратное увеличение активности химотрипсина по сравнению с зимогеном [24]. Катализу способствует также небольшое перемещение Gly 193, важное для стабилизации переходного состояния [24].

Преобразование химотрипсиногена в химотрипсин служит хорошей иллюстрацией характера конформационных изменений, которые могут происходить при аллостерическом переходе (гл. 2). Расщепление пептидной связи на поверхностном участке белковой глобулы, довольно сильно удаленном от активного центра, вызывает (подобно связыванию аллостерического эффектора) структурные изменения, ведущие к образованию субстратсвязывающего «кармана». При этом существенных изменений общей структуры не происходит; для конформационного перехода достаточны небольшие перемещения лишь нескольких из 230 аминокислотных остатков (см. гл. 6).

Хотя структура активационных пептидов трипсиногена и химотрипсиногена существенно различается (табл. 3.2), трипсин, эластаза и химотрипсина А и В имеют сходные черты: каждый из этих ферментов содержит около 230 аминокислот и специфически ингибируется ДФФ. Степень гомологии первичной структуры химотрипсинов А и В составляет 78%, а любой другой пары рассматриваемых ферментов — 40—55% [8]. Очень большое сходство наблюдается в последовательностях аминокислот, окружающих остатки, которые участвуют в формировании активного центра (табл. 3.3). Третичные структуры трипсина [25], эластазы [8] и химотрипсина А весьма близки, а системы передачи заряда идентичны (рис. 3.3); все это свидетельствует об одинаковом механизме катализа у рассматриваемых протеиназ. Разная спе-

цифичность этих ферментов обусловлена несколькими аминокислотными заменами в субстрат-связывающих «карманах». Четыре рассматриваемых фермента произошли, очевидно, от общего предшественника и относятся к обширному семейству сериновых протеиназ (табл. 3.3, разд. 3.2, 3.3). Анализ имеющихся данных показывает также, что в ходе эволюции варианты субстратной специфичности возникают легче, чем новые механизмы катализа. Возможно, это является общим правилом эволюции ферментов.

Из кристаллографических данных следует, что механизмы активации трипсиногена и химо трипсиногена сходны [26]. Исследование методом кругового дихроизма ацилферментных интермедиатов, образующихся в ходе катализа трипсином и трипсиногеном, показало, что субстрат связывается с ферментом и с зимогеном по-разному. Интересно, что присоединение N-концевого дипептида трипсина Ile-Val (табл. 3.3) к трипсиногену индуцирует переход последнего в «трипсиноподобную» конформацию и, наоборот, блокирование N-концевого Ile в молекуле трипсина индуцирует конформацию, подобную таковой у трипсиногена [26, 27]. Степень гомологии аминокислотных последовательностей двух изоферментов — карбоксипептидаз А и В — составляет 51% [28]. Третичная структура карбоксипептидазы А (но не карбоксипептидазы В) установлена с разрешением 0,2 нм; конформации зимогенов и, следовательно, структурные изменения, сопровождающие активацию, неизвестны.

3.1.4. Секреция и синтез

Регуляция действия панкреатических протеиназ осуществляется энтеропептидазой, секретинном и холецистокинином. Именно открытие секретина в 1902 г. [29] привело к введению термина «гормон» для обозначения молекулы, влияющей на метаболизм не той клетки, в которой она была синтезирована, а других клеток. Однако механизмы, благодаря которым секретин и холецистокинин стимулируют экзоци-

Таблица 3.3. Гомологичность сериновых протеиназ млекопитающих. Цифры соответствуют номерам аминокислотных остатков в последовательности молекулы хмготрипсина. А—N-концевые последовательности; В, С — последовательности, включающие остатки, участвующие в системе переноса заряда.

Фермент	А	В	С	Источники данных
	16	57	195	
Бычий хмготрипсин	<u>Ile-Val-Asp-Gly</u>	Trp-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Gly	Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu	[8]
Бычий трипсин	<u>Ile-Val-Gly-Gly</u>	Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Try	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val	[8]
Эластаза свиньи	<u>Val-Val-Gly-Gly</u>	Trp-Val-Met-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Val	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu	[8]
Бычий тромбин	<u>Ile-Val-Glu-Gly</u>	Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu	Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe	[39]
Бычий фактор XIIa	<u>Val-Val-Gly-Gly</u>	Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu ¹	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu	[32]
Бычий фактор IXa	<u>Val-Val-Gly-Gly</u>	Trp-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Ile	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His	[41]
Бычий фактор Xa	<u>Ile-Val-Gly-Gly</u>	Tyr-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His	[40]
Компонент комплек- мента человека C1s	<u>Ile-Ile-Gly-Gly</u>	Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Val	Cys-Lys-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Ala-Phe	[54, 55]
Компонент комплек- мента человека C1r	<u>Ile-Ile-Gly-Gly</u>	Trp-Ile-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Thr	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Val-Phe	[55]

¹ Fujikawa K., Davie W., личное сообщение.

тоз, а также ряд процессов, происходящих в ходе экзцитоза, остаются неясными.

Значительная часть информации о синтезе панкреатических зимогенов была получена при изучении бесклеточных систем трансляции. Подобно большинству других секретируемых белков, панкреатические зимогены синтезируются в виде препроферментов, имеющих на N-конце цепи дополнительный фрагмент из 20 остатков, отсутствующий в зрелом зимогене [15]. Эта так называемая «сигнальная последовательность», значительная часть которой представлена неполярными остатками, обеспечивает прохождение синтезированного белка через мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭР). На люминальной стороне ЭР сигнальная последовательность удаляется сигнальной пептидазой, и зрелый зимоген поступает в аппарат Гольджи, где происходит его упаковка в гранулы. Очевидно, что функционирование сигнальных пептидаз создает еще один важный механизм, благодаря которому биологическая функция индуцируется путем ограниченного протеолиза [30, 31].

3.2. Молекулярные основы свертывания крови

При повреждении кровеносных сосудов в организме начинают действовать три фактора, способствующие уменьшению кровопотери: сужение кровеносных сосудов, агрегация кровяных пластинок (тромбоцитов) и свертывание крови в области повреждения. Хотя механизм регуляции свертывания крови еще окончательно не выяснен, за последние годы в этом направлении были достигнуты значительные успехи. Это обусловлено тем обстоятельством, что все факторы, участвующие в свертывании крови (некоторые из них присутствуют в крови лишь в следовых количествах), недавно получены в высокоочищенном недеградированном состоянии и полностью отделены друг от друга. Это позволило исследовать их взаимодействие и выяснить важные аспекты механизма активации [32, 33]. В настоящем разделе приведен краткий обзор современных представлений об этой классиче-

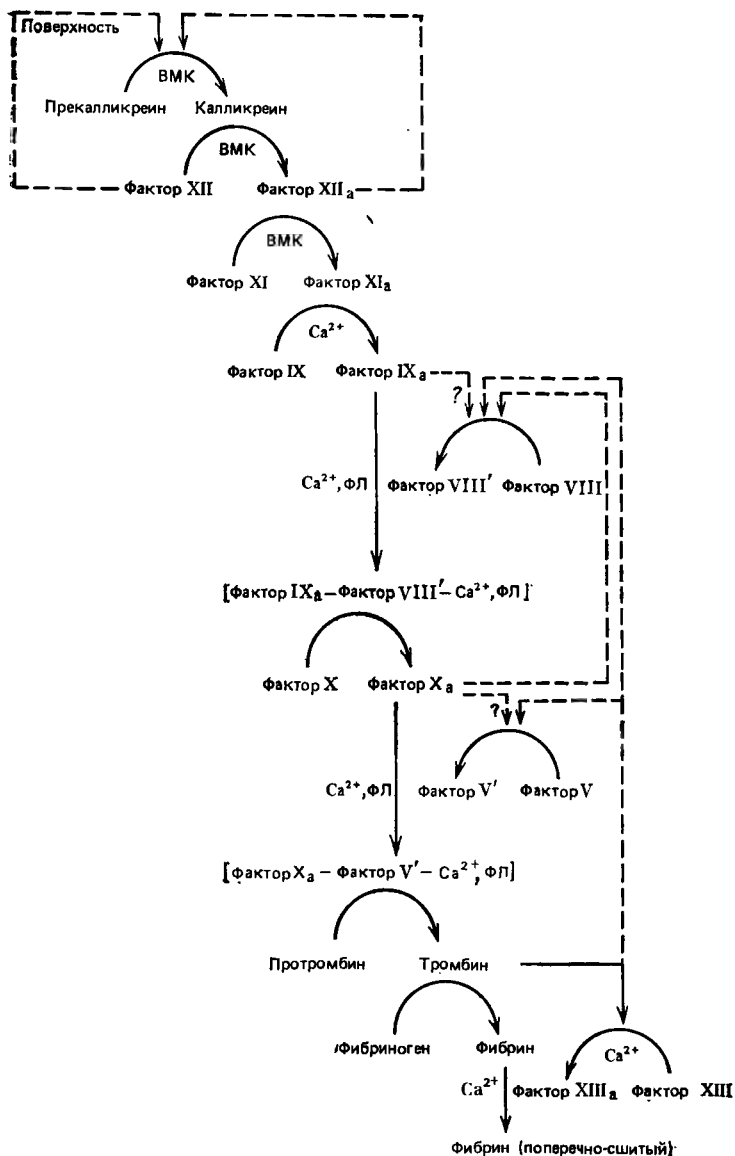


Рис. 3.4. Предполагаемый механизм процесса свертывания крови в плазме млекопитающих по внутреннему пути [32]. ФЛ — фосфолипид; а — активированная форма фактора свертывания; ВМК — высокомолекулярный кининоген.

ской системе регуляции ферментов путем ограниченного протеолиза.

Установлено, что *in vitro* функционируют два разных механизма свертывания крови, названные *внутренним* и *внешним* (рис. 3.4, 3.5). *Внутренний* использует только факторы плазмы крови, внешний — факторы, присутствующие как в плазме, так и в тканевых экстрактах. Хотя *in vitro* внешний и внутренний механизмы могут функционировать раздельно, *in vivo* важны оба. Об этом свидетельствуют клинические случаи нарушения свертываемости крови [34]. Для установления последовательности отдельных стадий свертывания крови очень важными оказались определенные генетические мутации. Вероятно, *in vivo* функционируют оба механизма одновременно, но с разной эффективностью в зависимости от конкретных условий.

При функционировании системы свертывания крови по внутреннему пути факторы, участвующие в ней, последовательно действуют друг на друга, что в конечном итоге приводит к превращению белка фибриногена в фибрин. Молекулы фибрина агрегируют по типу «конец к концу», а также «бок о бок»; при этом обра-

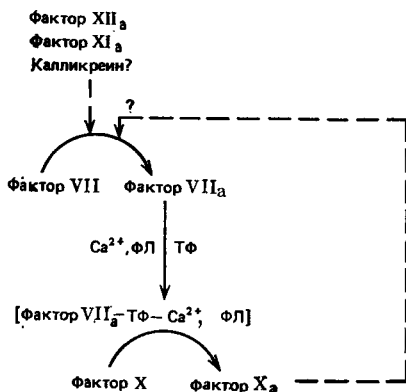


Рис. 3.5. Возможный механизм процесса свертывания крови по внешнему пути. ТФ — тканевой фактор; остальные сокращения такие же, как на рис. 3.4 [32].

зуется нерастворимый сгусток, который стабилизируется фактором XIIIa. Этот фактор представляет собой фермент трансклутаминазу, катализирующую образование поперечных ϵ (γ -глутамил)-лизиновых связей между боковыми цепями глутамина и лизина двух молекул фибрина.

Функционирование внутреннего пути можно рассматривать как пример феномена усиления (разд. 3.1); в значительной мере благодаря этому пути происходит быстрое образование сгустка фибрина (наступающее после короткого лаг-периода). Быстроте ответной реакции организма способствуют два дополнительных обстоятельства: *активация фактора VIII и фактора V по типу обратной связи* следовыми количествами фактора Ха и тромбина (рис. 3.4), а также увеличение эффективной концентрации этих факторов, которое объясняется тем, что они функционируют на фосфолипидной поверхности. Необходимо отметить, что в процессе свертывания крови по внешнему пути несколько факторов внутреннего пути не участвуют. Два пути соединяются на уровне действия фактора X, далее они идентичны. Следовательно, фактор X активируется *in vivo* двумя различными факторами.

Факторы XII, XI, IX, X, VII и протромбин представляют собой неактивные предшественники протеолитических ферментов, катализирующих активацию последующих факторов при наличии необходимых кофакторов. Фактор XIII — это предшественник фермента трансклутаминазы, но факторы VIII, V, фибриноген и, по-видимому, тканевой фактор не являются предшественниками ферментов. Тем не менее они превращаются в активные или более активные формы путем ограниченного протеолиза.

3.2.1. Внутренний и внешний пути системы свертывания крови

In vitro свертывание крови по внутреннему пути начинается с контакта фактора XII с поверхностью, т. е. со стенкой стеклянной пробирки, в которой проводится реакция. *In vivo* роль поверхности могут играть

фибриллярные белки, такие, как коллаген или эластин, окружающие поврежденный сосуд. Контакт с поверхностью стимулирует переход фактора XII в активированную форму — фактор XIIa, однако *in vitro* это происходит очень медленно. Было показано, что *in vitro* фактор XIIa в присутствии высокомолекулярного кининогена превращает прекалликреин в калликреин путем ограниченного протеолиза. Калликреин — это протеиназа плазмы крови, одной из функций которой является образование фармакологически активных пептидов, например брадикинина, из высокомолекулярного кининогена. Брадикинин вызывает несколько эффектов, например он стимулирует расслабление стенок кровеносных сосудов и, таким образом, способствует их расширению [35]. Было показано также, что калликреин *in vitro* превращает фактор XII в XIIa; это, возможно, служит механизмом усиления активации фактора XII вслед за образованием первых следов фактора XIIa (рис. 3.4). К сожалению, ранние стадии процесса свертывания крови еще не изучены достаточно полно. Обычно люди, у которых отсутствует фактор XII, выявляются случайно, поскольку у них не обнаруживаются серьезных нарушений свертывания крови [34]. Интересно, что первый пациент, у которого был отмечен недостаток фактора XII (Хагеман), скончался от тромбоза легочной артерии [36].

Фактор XIa превращает фактор IX в IXa. Фактор IXa сам по себе не может активировать фактор X; для этого он должен образовать комплекс с фактором VIII. Однако этот комплекс остается все-таки малоактивным (или даже неактивным) до тех пор, пока фактор VIII не превратится в фактор VIII'. *In vitro* это может произойти под действием тромбина и фактора Xa, однако остается неясным, каким образом эти активированные протеиназы образуются *in vivo*.

Люди, у которых отсутствует фактор VIII, страдают заболеванием, известным под названием *гемофилия*. Это наиболее распространенное нарушение свертывания крови; оно встречается у одного из 10 000 новорожденных [34]. Ген, обуславливающий гемофилию, локализован в X-хромосоме, поэтому женщины

являются, как правило, носителями этой болезни, а подавляющее большинство больных гемофилией — мужчины. Наиболее знатной носительницей гемофилии была королева Виктория. Ее пятый сын Леопольд страдал гемофилией и скончался в возрасте 31 года от кровоизлияния в мозг после легкого ушиба головы. Две дочери королевы Виктории также были носительницами гемофилии и передали болезнь другим королевским семьям в Европе. Это обстоятельство имело последствия и для царской семьи в России: единственный сын от брака дочери королевы Виктории Алисы с царем Николаем II оказался гемофиликом [37].

Превращение протромбина в тромбин, катализируемое факторами Ха и V, весьма сходно с активацией фактора X комплексом фактор IXa — фактор VIII'; при этом фактор V играет такую же роль, как фактор VIII'. Подобно тому как это происходит в случае фактора VIII, активность фактора V значительно увеличивается при его превращении в фактор V'. *In vitro* эта реакция катализируется тромбином и, возможно, фактором Ха. Очистка, и характеристика факторов V и VIII остается одной из важнейших задач в области изучения свертывания крови.

Механизм перехода фактора X в Ха при внешнем пути свертывания пока еще полностью не выяснен. Было установлено, что сначала фактор VII превращается в протеолитический фермент (фактор VIIa), однако для превращения фактора X в Ха необходим и тканевой фактор [38]. Возможно, что его роль аналогична роли факторов V' и VIII'. Известно, что *in vitro* фактор Ха может весьма эффективно превращать фактор VII в фактор VIIa. Однако вопрос о том, какой фактор осуществляет активацию фактора VII *in vivo*, остается открытым. Высказывались предположения, что это либо калликреин, либо фактор XIIa.

Для превращения фактора X в Ха комплексом фактор IXa — фактор VIII' или комплексом фактор VIIa — тканевой фактор, а также для превращения протромбина в тромбин системой фактор Ха — фактор V' абсолютно необходимы Ca^{2+} и фосфолипид; ионы Ca^{+} требуются и для перехода фактора IX в IXa

под действием фактора XIa. Молекулярный механизм соответствующих превращений рассмотрен в разд. 3.2.2.

3.2.2. Молекулярный механизм активации факторов свертывания крови

Все протеолитические ферменты — фактор XIIa, фактор XIa, фактор IXa, фактор VIIa, фактор Xa и тромбин — ингибируются ДФФ, который для этого реагирует с определенным остатком серина в их молекулах. Аминокислотные последовательности вокруг этого остатка серина и других фрагментов, участвующих в образовании активного центра, почти одинаковы у факторов IXa, Xa, XIIa, тромбина и панкреатических эндопептидаз. N-концевые последовательности, освобождающиеся при активации зимогенов, также гомологичны с таковыми панкреатических протеиназ (табл. 3.3). Эти данные, а также сопоставление полных аминокислотных последовательностей тромбина [39], фактора X [40] и фактора IX [41] свидетельствуют о том, что факторы свертывания крови (синтезируемые в печени) и панкреатические протеиназы произошли от общего белка-предшественника и функционируют по одинаковому каталитическому механизму. Можно полагать, что структурные перестройки, происходящие при активации зимогенов после разрыва связи, также сходны между собой. При превращении фактора X в Xa, катализируемом фактором IXa или фактором VIIa, происходит расщепление такой же связи Arg-Ile, как и у других зимогенов [42]. Превращение фактора IX в IXa, осуществляемое фактором XIa, начинается с расщепления связи Arg-Ala, однако это еще не приводит к активации; она наступает лишь при последующем расщеплении связи Arg-Ile. При переходе протромбина в тромбин вначале расщепляется связь Arg-Thr (без активации), а затем связь Arg-Ile, это приводит к активации. Для того чтобы превратить фибриноген в фибрин, тромбин расщепляет четыре связи Arg-Gly, а для превращения фактора XIII в XIIIa — одну связь Arg-Gly.

Таким образом, в каждом случае активация происходит в результате разрыва очень небольшого числа пептидных связей. По специфичности рассматриваемые ферменты очень сходны с трипсином; трипсин может действовать подобно фактору IXa и фактору Xa. Вместе с тем факторы свертывания крови являются чрезвычайно специфичными протеиназами; они расщепляют только одну или две пептидные связи в одном или двух белках. Причина этого кроется, по-видимому, в способности ферментов узнавать более протяженную аминокислотную последовательность, чем Arg-X, которую узнает трипсин. С этой точки зрения интересно, что в протромбине две связи, расщепляемые фактором Xa, расположены в участках молекулы, имеющих одинаковую аминокислотную последовательность Ile-Glu-Gly-Arg [43].

Протромбин является одним из четырех факторов свертывания (кроме него в эту группу входят факторы IX, VII и X), для биосинтеза которых необходим витамин K [44]. У животных, получающих рацион, лишенный витамина K, синтезируется дефектный протромбин, который не связывает Ca^{2+} и не активируется *in vivo*; однако *in vitro* этот протромбин способен активироваться трипсином, и, следовательно, у него сохранен активный центр. В настоящее время установлено, что нормальный протромбин содержит в положениях 7 и 8, 15 и 17, 20 и 21, 26 и 27, а также 30 и 33 от N-конца молекулы γ -карбоксиглутаминовую кислоту (Gla), ранее не встречавшуюся в составе белков [45]; у животных с недостаточностью витамина K в указанных положениях находятся остатки глутаминовой кислоты. По-видимому, этим объясняются нарушения в связывании Ca^{2+} дефектным протромбином, поскольку в норме ион Ca^{2+} связывается с двумя соседними остатками Gla подобно тому, как он связывается с ЭДТА. Фосфолипид взаимодействует с протромбином через Ca^{2+} , который, как уже говорилось, связан с Gla; это обеспечивает связывание комплекса фактор Xa — фактор V' с протромбином, что необходимо для процесса активации. Фактор X и фактор IX, так же как и протромбин, имеют в соответствующих положениях

остатки Glu; активация этих зимогенов происходит аналогично активации протромбина [42]. Приведенные данные позволили выяснить роль витамина K, который, как оказалось, необходим для ферментной системы, превращающей глутаминовую кислоту в γ -карбоксиглутаминовую [44].

В крови были найдены еще три витамин-K-зависимых белка, содержащие остатки Glu; они получили название белок C [46], белок S [47] и белок Z [48]. Функции этих белков неизвестны; показано, что белок C может превращаться в активную протеиназу под действием тромбина. Эта протеиназа обладает *антикоагулирующей* активностью, так как она способна расщеплять фактор V и фактор VII [49].

3.3. Активация системы комплемента [50—53]

Первой реакцией организма млекопитающего на внедрение чужеродного агента, например бактерии, является образование специфических антител, которые формируют иммунные комплексы с внедрившейся клеткой. Последующий ответ реализуется при участии системы комплемента — группы белков плазмы крови, которые вначале распознают иммунные комплексы, а затем вызывают структурные повреждения чужеродной клетки. В третьей фазе в плазме крови происходит фагоцитоз поврежденных клеток лейкоцитами, моноцитами и макрофагами. Компоненты классической системы комплемента (рис. 3.6) C1r, C1s и C2 являются предшественниками протеиназ, компоненты C3, C4 и C5 превращаются в функционально активные производные путем ограниченного протеолиза.

Процесс начинается с того, что компонент C1 узнает комплекс, образованный иммуноглобулином IgG или IgM с внедрившейся клеткой. Узнавание осуществляет C1q, который специфически связывается с антителом. По-видимому, это взаимодействие индуцирует изменение конформации C1q, далее происходит конформационное изменение C1r, которое превращает его в протеиназу C1r. Этот фермент расщепляет затем одну пептидную связь в молекуле C1s, превращая его в

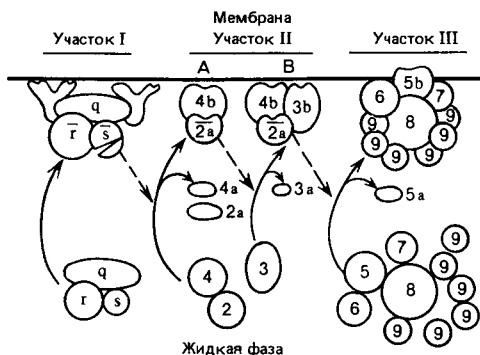


Рис. 3.6. Схема классического пути комплемента: q, r и s — субъединицы комплекса C1; a и b — соответственно N- и C-концевые фрагменты модифицированных факторов. Протеиназы обозначены горизонтальными черточками [50].

протеиназу $C1s$. $C1r$ и $C1s$ ингибируются ДФФ, и аминокислотные последовательности вокруг модифицированных остатков серина показывают, что эти белки входят в семейство сериновых протеиназ (табл. 3.3).

$C1s$ расщепляет пептидные связи в компонентах C4 и C2, в результате чего образуются компоненты C4b (C-концевой фрагмент C4) и C2a (C-концевой фрагмент C2). C4b связывается с другим участком на мембране внедрившейся клетки. C2a образует комплекс с C4b и становится протеиназой. Затем комплекс C2a—C4b расщепляет C3 [56]. Комплекс C2a—C4b—C3b расщепляет C5. C-концевой фрагмент C5 (C5b) стимулирует образование комплекса между всеми остальными компонентами комплемента в третьем участке мембраны внедрившейся клетки; при этом дальнейшего протеолиза не происходит. Внедрение комплекса C5b—9 в мембрану нарушает ее упорядоченную структуру, и она становится проницаемой.

Комплексы C2a—C4b и C2a—C4b—C3b представляют собой высокоспециализированные протеиназы. Единственным известным субстратом для первого комплекса является C3, а для второго — C5. Таким образом, C2a можно считать особой протеиназой, специ-

фичность которой определяется взаимодействием с двумя регуляторными субъединицами C4b и C3b.

Связывание C3b и C4b с клеточной мембраной, по-видимому, способствует фагоцитозу чужеродных клеток лейкоцитами, моноцитами и макрофагами. Следует добавить, что фрагменты C3a и C5a, которые непосредственно «не используются» в системе комплемента (рис. 3.6), обладают несколькими видами собственной биологической активности; например, они вызывают сокращение гладких мышц, а C5a стимулирует хемотаксическое движение лейкоцитов.

В плазме крови существует и вторая система комплемента, которая встречается наряду с уже описанной, классической системой на уровне C3. Путь превращений, в котором участвует вторая система, называется альтернативным путем. Он активируется иммунными комплексами, которые образуют иммуноглобулины IgG и IgA, а также некоторыми структурами иной природы, такими, как клеточные стенки дрожжей или бактерий.

Фермент, расщепляющий C3 на альтернативном пути, представляет собой комплекс, образованный протеиназой, названной *фактором В*, и C3b. Подобная ситуация, при которой продукт реакции (C3b) является одновременно компонентом фермента, катализирующего эту реакцию, означает, что альтернативный путь способен к самоускорению. Фактор В активируется при расщеплении сериновой протеиназой — фактором D. Фактор D, вероятно, уникален среди сериновых протеиназ плазмы в том отношении, что для него не известен зимоген, и он циркулирует в форме активного фермента. Однако, как отмечено выше, расщепление фактора В фактором D происходит только в том случае, если первый находится в комплексе с C3b. Таким образом, для активации альтернативного пути комплемента необходимо, чтобы произошло расщепление C3 либо по классическому, либо по другому, еще неизвестному механизму.

Фактор В альтернативного пути и фактор C2 классического пути относятся к новому семейству сериновых протеиназ. Они значительно больше по величине,

чем протеиназы семейства трипсина [57], и не имеют характерных N-концевых последовательностей (табл. 3.3); в то же время последовательности вокруг остатков гистидина и серина, участвующих в системе переноса заряда, у них такие же, как и у других сериновых протеиназ.

Недавно была охарактеризована еще одна сериновая протеиназа, названная C3b/C4b — инактиватор или фактор I; этот фактор лишает C3b и C4b их биологической активности путем ограниченного протеолиза [58]. Специфичность фактора I обусловлена присутствием других регуляторных белков. При наличии фактора H он расщепляет C3b относительно специфично. Однако после образования комплекса с другим белком плазмы, названным C4b-связывающим белком, фактор I предпочтительно расщепляет C4b [59].

3.4. Заключение

«Ограниченный протеолиз — это высокоспецифичный необратимый процесс, который может инициировать физиологическую функцию путем превращения белка-предшественника в его биологически активную форму» [11]. В то же время ограниченный протеолиз может служить механизмом, обеспечивающим прекращение какой-либо биологической активности. Ограниченный протеолиз используется для регуляции широкого круга процессов у эукариот; помимо переваривания белков, свертывания крови и защитной реакции организма с его помощью регулируется кровяное давление [60], процессинг ряда пептидных гормонов [61], оплодотворение [62] и синтез структур соединительной ткани [63].

Большинство ферментов, которые синтезируются в виде предшественников, относятся к классу протеиназ. Исключения составляют панкреатическая фосфолипаза A [64], фактор XIIIa и хитинсинтетаза [65], образующая полимер N-ацетилглюкозамина в растущих дрожжах.

Изучение генетического полиморфизма ферментов у млекопитающих, а также мутантных форм бактери-

альных ферментов, принесло неоценимую пользу для выяснения путей ограниченного протеолиза *in vivo*. Можно полагать, что механизм этого процесса и его роль в регуляции активности ферментов еще много лет будут оставаться важной областью исследований.

Литература

1. *Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. M.* In: *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1948.
2. *Sjoström H., Noren O.* *Biochem. Biophys. Acta*, **359**, 177—185 (1974).
3. *Delange R. J., Smith E. L.* In: *The Enzymes III* (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 81—118, 1971.
4. *Wormsley K. G.* In: *Scientific Basis of Gastroenterology* (H. L. Duthie and K. G. Wormsley, eds.), Churchill-Livingstone, Edinburgh, pp. 163—248, 1979.
5. *Johnson L. R.* In: *Gastrointestinal Physiology—MTP International Review of Science* (E. D. Jacobson and L. L. Shanbour, eds.), Butterworths, London and University Park Press, Baltimore, pp. 1—43, 1974.
6. *Preshaw R. M.* In: *Gastrointestinal Physiology—MTR International Review of Science* (E. D. Jacobson and L. L. Shanbour, eds.), Butterworths, London and University Park Press, Baltimore, pp. 265—291, 1974.
7. *Hadorn B., Tarlow M. J., Lloyd J. K., Wolff O. H.* *The Lancet*, pp. 812—813, 1969.
8. *Hartley B. S., Shotten D. M.* In: *The Enzymes III* (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 323—373, 1971.
9. *Kraut J.* In: *The Enzymes III* (3rd ed.), (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 165—183, 1971.
10. *Blow D. M.* In: *The Enzymes III* (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 185—212, 1971.
11. *Neurath H., Walsh K. A., Gertler A.* In: *Metabolic Interconversions of Enzymes* (E. H. Fischer, E. G. Krebs, H. Neurath and E. R. Stadtman, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 301—312, 1974.
12. *Wintersberger E., Cox D. J., Neurath H.* *Biochemistry*, **1**, 1069—1078 (1962).
13. *Kobayashi Y., Kobayashi R., Hirs C. H. W.* *J. Biol. Chem.*, **256**, 2466—2470 (1981).
14. *Maroux S., Baratti J., Desnuelle P.* *J. Biol. Chem.*, **246**, 5031—5039 (1971).
15. *Macdonald R. J., Swift G. H., Quinto C., Swain W., Pictet R. L., Nikovits W., Rutter W. J.* *Biochemistry*, **21**, 1453—1463 (1981).
16. *Quinto C., Quiroga M., Swain W. F., Nikovits W. C., Standing D. N., Pictet R. L., Valenzuela P., Rutter W. J.* *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)*, **79**, 31—35 (1982).

17. Hartsuck J., Lipscomb W. N. In: *The Enzymes III* (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 1—56, 1971.
18. Ruhlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. *J. Mol. Biol.*, **77**, 417—436 (1973).
19. Keller P. J., Allan B. J. *J. Biol. Chem.*, **242**, 281—287 (1967).
20. Banks P., Bartley W., Burt L. M. *The Biochemistry of the Tissues*, 2nd Edition, John Wiley and Son, London, 1976.
21. Sigler P. B., Blow D. M., Matthews B. W., Henderson R. J. *Mol. Biol.*, **35**, 143—164 (1968).
22. Freer S. T., Kraut J., Robertus J. D., Wright H. T., Xuong Ng. H. *Biochemistry*, **9**, 1997—2009 (1970).
23. Wright H. T. *J. Mol. Biol.*, **79**, 1—11 and 13—23 (1973).
24. Kerr M. A., Walsh K. A., Neurath H. *Biochemistry*, **15**, 5566—5570 (1976).
25. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E. *J. Mol. Biol.*, **83**, 185—208 (1974).
26. Bode W. *J. Mol. Biol.*, **197**, 357—374 (1979).
27. Kerr M. A., Walsh K. A., Neurath H. *Biochemistry*, **14**, 5088—5094 (1975).
28. Titani K., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1666—1670 (1975).
29. Bayliss W. M., Starling E. H. *J. Physiol.*, **28**, 325—353 (1902).
30. Warren G. *Nature*, **297**, 624—625 (1982).
31. Meyer D. I., Krause E., Dobberstein B. *Nature*, **297**, 647—650 (1982).
32. Davie E. W., Fujikawa K., Kurachi K., Kiesel W. *Adv. Enzymol.*, **48**, 277—318 (1977).
33. Jackson C. M., Nemerson Y. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 765—811 (1980).
34. Kiesel W., Fujikawa K., Davie E. W. *Biochemistry*, **16**, 4189—4194 (1977).
35. McKusick V. A. *Scientific American*, **213**, 88—95 (1965).
36. Bloom A. L., Thomas O. P. (eds.). *Haemostasis and Thrombosis*, Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1981.
37. Cochrane C. G., Griffin J. H. *Advances in Immunology*, **33**, 241—306 (1982).
38. Ratnoff O. D. In: *The Molecular Basis of Inherited Disease* (J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D. S. Frederickson, eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 1670—1709, 1973.
39. Magnusson F. In: *The Enzymes III* (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 277—321, 1971.
40. Titani K., Fujikawa K., Enfield D. L., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 3082—3086 (1975).
41. Katayami K., Ericsson L. H., Enfield D. L., Walsh K. A., Neurath H., Davie E. W., Titani K. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **76**, 4990—4994 (1979).
42. Fujikawa K., Coan M. H., Legaz M. E., Davie E. W. *Biochemistry*, **13**, 5290—5299 (1974).
43. Soltrup-Jensen L., Zajdel M., Claeys H., Petersen T. E., Magnusson S. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **72**, 2577—2681 (1975).

44. *Suttie J. W.* Critical Reviews of Biochemistry, **8**, 191—223 (1980).
45. *Stenflo J. J.* Biol. Chem., **249**, 5527—5535 (1974).
46. *Stenflo J. J.* Biol. Chem., **251**, 355—360 (1976).
47. *Discipio R. G., Hermodson M. A., Yates S. G., Davie E. W.* Biochemistry, **16**, 698—702 (1977).
48. *Prowse C. V., Esnouf M. P.* Biochem. Soc. Trans., **5**, 255 (1977).
49. *Kisiel W., Davie E. W.* Methods Enzymol., **80**, 320—332 (1981).
50. *Muller-Eberhard H. J.* Ann. Rev. Biochem., **44**, 697—724 (1975).
51. *Muller-Eberhard H. J.* In: Molecular Basis of Biological Degradation Processes (R. D. Berliner, H. Herman, I. H. Lepow and J. M. Tanzer, eds.), Academic Press, New York, pp. 65—114, 1978.
52. *Porter R. R., Reid K. B. M.* Adv. Prot. Chem., **33**, 1—71 (1979).
53. *Reid K. B. M., Porter R. R.* Ann. Rev. Biochem., **50**, 433—464 (1981).
54. *Arlaud G. J., Gagnon J., Porter R. R.* Biochem. J., **201**, 49—59 (1982).
55. *Carter P. E., Dunbar B., Fothergill J. E.* Biochem. Soc. Trans., **10**, 441—442 (1982).
56. *Kerr M. A.* Biochem. J., **189**, 173—181 (1981).
57. *Kerr M. A.* Biochem. J., **183**, 615—622 (1979).
58. *Crossley L. G.* In: Methods in Enzymology, vol. **80**, Academic Press, London and New York, pp. 112—124, 1981.
59. *Nussenzweig V., Metton R.* In: Methods in Enzymology, vol. **80**, Academic Press, London and New York, pp. 124—133, 1981.
60. *Ondetti M. A., Cushman D. W.* Ann. Rev. Biochem., **51**, 283—308 (1982).
61. *Docherty K., Steiner D. F.* Ann. Rev. Physiol., **44**, 625—638 (1982).
62. *Schapiro B. H., Schackmann R. W., Gabel C. A.* Ann. Rev. Biochem., **50**, 815—843 (1981).
63. *Bornstein P., Saze H.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 957—1003 (1980).
64. *De Haas G. H., Slotboom A. J., Bensen P. P. N., Van Deenen L. L. H., Maroux S., Puigserver A., Desnuelle P.* Biochem. Biophys. Acta, **221**, 31—53 (1970).
65. *Cabib E., Roberts R., Bowers B.* Ann. Rev. Biochem., **51**, 763—794 (1982).

4. Регуляция ферментов путем обратимого фосфорилирования: нервная и гормональная регуляция клеточной активности

О наличии фосфора в белках известно уже свыше 100 лет, однако его роль стала ясна только после открытия регуляции активности ферментов путем обратимого фосфорилирования. Развитие исследований в этом направлении связано с работами Эдвина Кребса, Эдмонда Фишера и Джозефа Лернера в период 1955—1970 гг. Эти авторы показали, что нервная и гормональная регуляция метаболизма гликогена осуществляется путем изменения состояния фосфорилирования гликогенфосфорилазы [1], киназы фосфорилазы [2] и гликогенсинтазы [3].

Эти три фермента оставались единственными примерами данного феномена примерно до конца 1960 г., когда ситуация быстро изменилась в связи с обнаружением зависимой от циклического АМР протеинкиназы [4]. Последние 10 лет характеризовались бурным развитием исследований в этой области. Теперь известно около 40 ферментов, активность которых регулируется путем обратимого фосфорилирования, и этот механизм считается основным в регуляции внутриклеточных процессов внеклеточными (нервными и гормональными) стимулами.

В первой части данной главы рассмотрена регуляция метаболизма гликогена в скелетной мышце, поскольку эта система наиболее обстоятельно изучена на молекулярном уровне и служит моделью, с которой сравнивают другие системы. Во второй части рассмотрена регуляция других метаболических путей, а также роль фосфорилирования белков в координации процессов, происходящих в клетке в ответ на нервные и гормональные сигналы.

4.1. Метаболизм гликогена в скелетной мышце

Гликоген — это главная форма депонирования углеводов в клетках млекопитающих; в скелетной мышце его превращение в молочную кислоту при анаэробном гликолизе обеспечивает значительную часть АТР, требуемого для осуществления мышечных сокращений. Необходимо поэтому, чтобы скорость гликогенолиза была четко согласована с началом сокращений, а также их силой и продолжительностью. Гликоген может мобилизоваться и в *покоящейся* мышце в ответ на адреналин — гормон, выделяемый надпочечниками при стрессе; это обеспечивает мобилизацию резервов перед началом сокращения для удовлетворения возрастающей потребности в энергии.

Гликоген ресинтезируется в *покоящейся* мышце; этот процесс ускоряется в присутствии инсулина — гормона, секретируемого β -клетками поджелудочной железы в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови. Инсулин стимулирует транспорт глюкозы в мышцу, активируя переносчик глюкозы в плазматической мембране [5], в результате чего значительная часть перешедшей в ткань глюкозы используется для синтеза гликогена.

4.2. Открытие регуляции ферментов путем обратимого фосфорилирования

Ферментом, лимитирующим скорость гликогенолиза, является гликогенфосфорилаза, которая катализирует последовательные реакции фосфоролиза α -1,4-гликозильных связей в гликогене с образованием глюкозо-1-фосфата (Г1Ф). Еще в 1938 г. были выделены две формы фосфорилазы, получившие обозначения *b* и *a* [6]. Активность фосфорилазы *b* зависит от наличия в системе аденозин-5'-монофосфата (АМР), в то время как фосфорилаза *a* в отсутствие АМР практически не теряет своей активности. Естественно было предположить, что фосфорилаза *a* содержит прочно связанный АМР. В это же время в мышце был обнаружен фермент, который превращает фосфорилазу *a*

в фосфорилазу *b*; его называли PR-ферментом (prosthetic group removing-ферментом, удаляющим протетическую группу), поскольку предполагали, что он удаляет связанный АМР [7]. Эти представления, однако, не получили подтверждения; истинная природа процесса трансформации фосфорилазы была выяснена 10 лет спустя. В 1956 г. Кребс и Фишер показали, что фосфорилазу *b* можно превратить в фосфорилазу *a* с помощью Mg-АТР-зависимого фермента, названного киназой фосфорилазы [1], который катализирует перенос γ -фосфорильной группы АТР на уникальный остаток серина, локализованный около N-конца молекулы белка [8]. Из этого следовало, что активность, которая превращала фосфорилазу *a* обратно в фосфорилазу *b*, принадлежала фосфатосвобождающему (phosphate releasing, или PR!) ферменту; в настоящее время его называют протеинфосфатазой-1 [9].

4.3. Регуляция мышечного сокращения [10]

Прежде чем обсуждать механизмы синхронизации гликогенолиза и мышечного сокращения, необходимо кратко рассмотреть основные сведения о строении и функционировании мышцы.

Фибриллы скелетной мышцы образованы регулярно уложенными пучками нитей двух типов, обозначаемых А и I (рис. 4.1). Мышечное сокращение связано

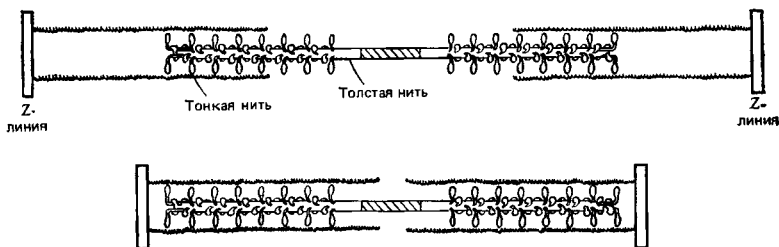


Рис. 4.1. Схема расположения толстых (А) и тонких (I) нитей в саркомере расслабленной (вверху) и сокращенной (внизу) мышцы. На схеме показан продольный срез саркомера — повторяющейся единицы миофибриллы. Мышечное волокно образовано несколькими тысячами миофибрилл.

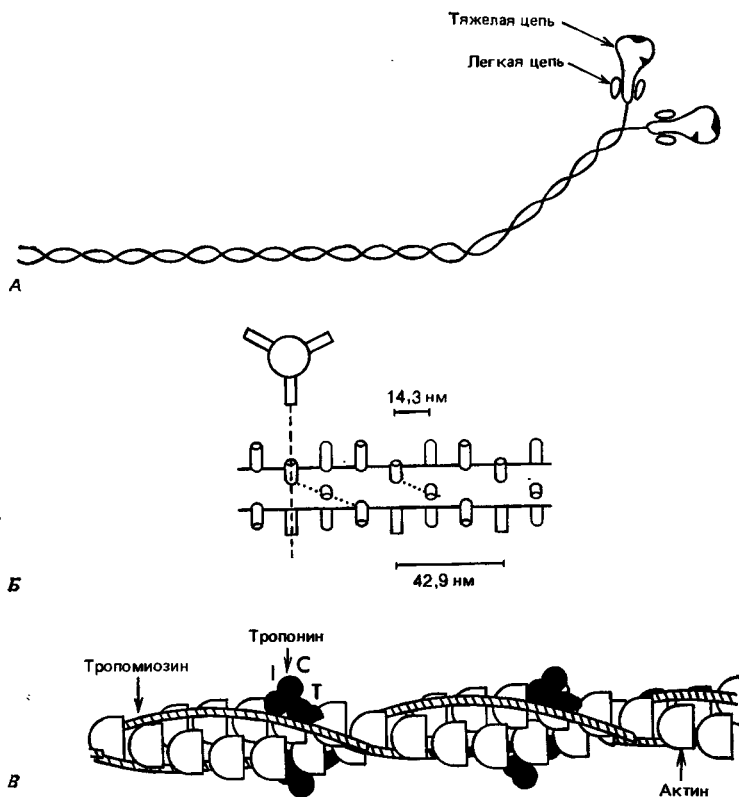
с процессом, при котором I-нити (состоящие в основном из белка актина) скользят вдоль А-нитей (состоящих в основном из белка миозина). Это приводит к уменьшению длины фибриллы (объем ее при этом остается постоянным) и развитию напряжения.

Белок скелетной мышцы млекопитающих миозин состоит из трех субъединиц: полипептида, называемого *тяжелой* цепью ($M_r=200\,000$), и двух типов *легких* цепей ($M_r=20\,000$); молекула миозина содержит по две копии каждой из этих трех субъединиц. Под электронным микроскопом она выглядит как палочка, образованная двойной спиралью; палочка оканчивается двумя глобулярными головками, которые называют «поперечными мостиками» (рис. 4.2, А). Легкие цепи локализованы только в области головок. Молекулы миозина упакованы в А-нитех упорядоченным образом в виде спирали, при этом наружу выступают поперечные мостики (рис. 4.2, Б); именно они обладают АТР-активностью.

По существу миозин является ферментом. При сокращении, когда актин скользит вдоль миозина, происходит взаимодействие актина с головками миозина; это взаимодействие приводит к стократной (или более) активации актомиозиновой АТРаза. Следствием связывания актина с миозином является генерация напряжения, при этом источником энергии для осуществления механической работы служит гидролиз АТР.

Мономер актина представляет собой глобулярный белок ($M_r=42\,000$), который полимеризуется в виде двойной спирали, образуя I-нить. Эта нить содержит еще два белка — тропомиозин и тропонин (рис. 4.2, В). Тропонин состоит из трех субъединиц: TN-T, TN-I и TN-C. Тропомиозин и TN-I — это компоненты, которые в покое мышце препятствуют взаимодействию актина и миозина и, следовательно, активации актомиозиновой АТРаза. В покое мышце в результате активного транспорта практически все ионы кальция удерживаются в окружающей миофибриллы мембранной структуре, называемой саркоплазматическим ретикуломом. После стимуляции нерва, подходящего к

мышце, саркоплазматический ретикулум становится проницаемым для Ca^{2+} (механизм этого явления еще не выяснен), и концентрация Ca^{2+} в мышечной цитоплазме повышается от 0,1 мкМ (или ниже) до примерно 10 мкМ. Ca^{2+} связывается с TN-C, в результате чего последний более прочно связывается с TN-I. Это нейтрализует ингибирование актомиозиновой АТФазы



комплексом тропомиозин—TN-I, происходит гидролиз АТР и начинается сокращение. TN-T связывается с тропомиозином; это необходимо для восстановления полной чувствительности к Ca^{2+} в реконструированной системе. При прекращении нервной стимуляции Ca^{2+} быстро переходит в саркоплазматический ретикулум, и сокращение заканчивается.

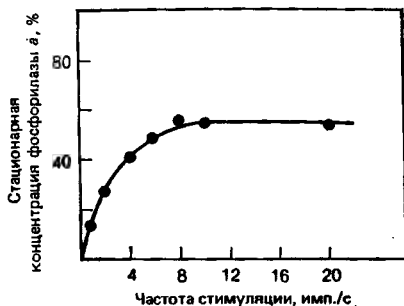
Итак, сократительный аппарат можно рассматривать как весьма сложный фермент, в состав которого входят каталитическая субъединица (поперечный мостик тяжелой цепи) и несколько регуляторных субъединиц, одна из которых, TN-C, связывает аллостерический активатор Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} приводит к ряду аллостерических переходов, в результате чего активируется АТРаза и саркомер укорачивается на 20—50%. Концентрация Ca^{2+} регулируется нервными импульсами, вызывающими изменение проницаемости саркоплазматического ретикулума.

4.4. Синхронизация гликогенолиза и мышечного сокращения: активация киназы фосфорилазы ионами кальция, кальмодулином и тропонином

АТРазная активность актомиозина за несколько миллисекунд, необходимых для развития максимального напряжения, увеличивается более чем в 100 раз. Поскольку количество АТР в покоей мышце (около 7 мМ) может обеспечить энергичное сокращение лишь в течение непродолжительного периода времени (менее 1 с), то очевидно, что необходимы эффективные механизмы для регенерации гидролизующего АТР. Один из таких механизмов, обеспечивающий регенерацию АТР в течение нескольких секунд, — это фосфорилирование ADP за счет креатинфосфата (25 мМ); в дальнейшем регенерация АТР обеспечивается почти исключительно за счет энергии превращения гликогена в лактат.

В течение секунд после начала сокращения скорость гликогенолиза увеличивается в несколько сотен раз. Очевидно, это связано с соответствующим увеличением активности гликогенфосфорилазы, поскольку в

Рис. 4.3. Влияние частоты электрических импульсов на уровень фосфорилазы a в изолированной портяжной мышце лягушки. Полупериод достижения стационарного уровня фосфорилазы a при частоте 2 имп./с — 30 с, а при частоте 6 имп./с — 10 с [11].



настоящее время установлено, что в покоящейся мышце почти вся фосфорилаза находится в неактивной b -форме. При сокращении изолированной мышцы лягушки под действием электрических импульсов определенной продолжительности и частоты b -форма превращается в активную a -форму. Данной частоте импульсов соответствует определенная стационарная концентрация фосфорилазы a , эта концентрация отражает относительные активности киназы фосфорилазы и протеинфосфатазы-1 (рис. 4.3). При увеличении частоты импульсов стационарная концентрация фосфорилазы a повышается, а время, необходимое для ее достижения, уменьшается. При частоте импульсов, вызывающей состояние тетануса, стационарная концентрация фосфорилазы a составляет 70% (суммарное количество фосфорилазы принято за 100%); при этом полупериод достижения стационарного состояния составляет менее 1 с (рис. 4.4). При увеличении частоты

Рис. 4.4. Влияние тетанического сокращения на уровень фосфорилазы a в хвостобедренной (*caudofemoralis*) мышце мыши *in situ*; ○ — нормальная мышь (линия C-57); ● — мышь линии I, у которой полностью отсутствует киназа фосфорилазы [12].



импульсов возрастает также скорость гликогенолиза; при частоте всего лишь 0,8 имп./с она более чем в 100 раз превышает исходную скорость, при этом стационарная концентрация фосфорилазы *a* составляет около 10% (рис. 4.3) [13].

Приведенные данные показывают, что появление фосфорилазы *a* является важным фактором в синхронизации гликогенолиза и мышечного сокращения. Они свидетельствуют также о том, что в покое киназа фосфорилазы неактивна и превращается в активную форму при мышечном сокращении. Как было установлено, один и тот же сигнал вызывает сокращение и активирует киназу фосфорилазы; этим сигналом служат ионы кальция (рис. 4.5).

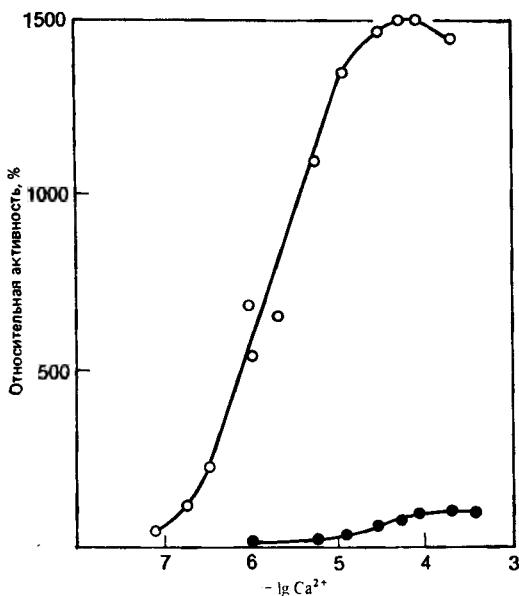


Рис. 4.5. Зависимость активности киназы фосфорилазы от концентрации ионов кальция; ● — дефосфорилированная *b*-форма; ○ — фосфорилированная *a*-форма. *b*-форма (но не *a*-форма) может активироваться в 20—30 раз под действием TN-C при концентрации ионов Ca^{2+} 1—3 мкМ [14].

Киназа фосфоорилазы состоит из субъединиц четырех типов — α , β , γ , δ и имеет структуру $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ [15]. γ -Субъединица представляет собой каталитически активный [16], а δ -субъединица — Ca^{2+} -связывающий компонент [17]. Предпосылкой для активации γ -субъединицы является связывание Ca^{2+} с δ -субъединицей.

δ -Субъединица идентична белку, называемому кальмодулином (рис. 4.6). По структуре кальмодулин сходен с TN-C — белком, который ответствен за чувствительность сократительного аппарата мышцы к Ca^{2+} (разд. 4.3). Как и TN-C, кальмодулин способен связывать до четырех ионов кальция (на 1 молекулу белка) при микромолярной концентрации последнего; сродство к Ca^{2+} двух связывающих участков в N-кон-

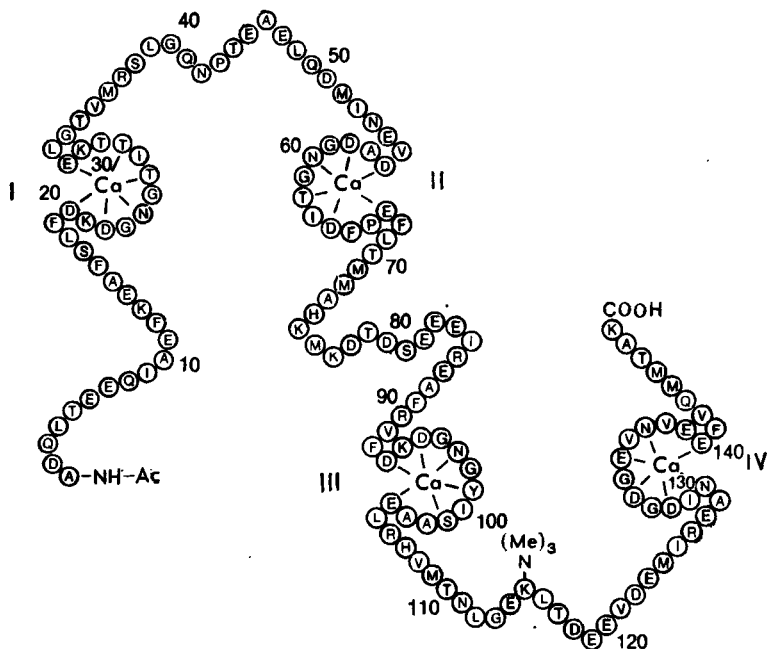


Рис. 4.6. Аминокислотная последовательность кальмодулина; для обозначения аминокислот использован однобуквенный код. Показаны четыре предполагаемых Ca^{2+} -связывающих домена [18].

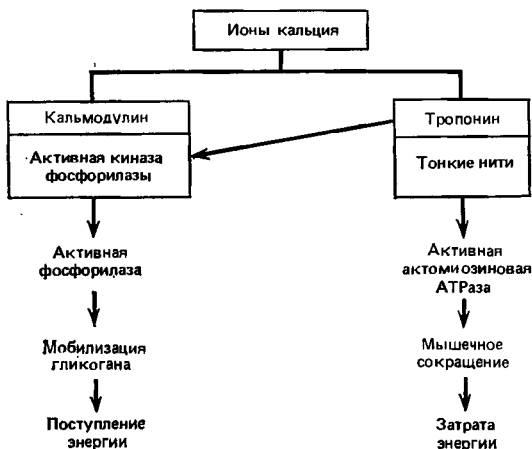


Рис. 4.7. Роль Ca^{2+} , кальмодулина и тропонина-С в синхронизации гликогенолиза и мышечного сокращения.

цевой половине молекулы кальмодулина в 10 раз выше, чем двух других связывающих участков в С-концевой половине молекулы [19].

Было установлено, что киназа фосфорилазы взаимодействует со второй молекулой кальмодулина, называемой δ' -субъединицей; при этом происходит сильная активация дефосфорилированной формы фермента [14]. δ' -Субъединица связывается с α - и β -субъединицами киназы фосфорилазы только в присутствии Ca^{2+} ; этим она отличается от δ -субъединицы, которая остается в комплексе с γ -субъединицей даже в отсутствие Ca^{2+} [20]. *In vitro* активаторами киназы фосфорилазы вместо δ' -субъединицы могут служить TN-C, а также тропониновый комплекс и даже искусственно полученные тонкие нити, а *in vivo* роль активатора выполняет, вероятно, TN-C [14, 15]. Таким образом, хотя для активации фермента достаточно взаимодействия Ca^{2+} с δ -субъединицей, гораздо более сильная (в 20—30 раз) активация происходит при взаимодействии с TN-C при микромолярных концентрациях Ca^{2+} .

Активация гликогенолиза и мышечного сокращения одним и тем же Ca^{2+} -связывающим белком (TN-C) может служить примером эффективного механизма сопряжения этих двух процессов (рис. 4.7).

4.5. Роль субстратов и аллостерических эффекторов в регуляции гликогенолиза

Повышение активности фосфорилазы *b* при взаимодействии с АМР было первым примером действия аллостерического эффектора [6]. Фосфорилаза *b* в отсутствие АМР неактивна, однако в его присутствии она так же активна, как и фосфорилаза *a*. Повышение активности фосфорилазы *b* при взаимодействии с АМР критически зависит от концентрации субстрата — неорганического фосфата (P_i). При увеличении концентрации P_i концентрация АМР, необходимая для достижения полумаксимальной активации, K_a , уменьшается, и наоборот, при увеличении концентрации АМР K_m для P_i снижается [21]. Следовательно, P_i и АМР являются *синергическими* активаторами фосфорилазы. В то же время АТФ и глюкозо-6-фосфат (Г6Ф) выступают как антагонисты АМР.

В отсутствие АМР фосфорилаза *a* почти так же активна, как и при его наличии, но только при насыщающих концентрациях субстратов. При низких же концентрациях P_i и гликогена активность *a*-формы в значительной степени зависит от присутствия АМР [22], однако K_a для АМР у *a*-формы примерно в 100 раз меньше, чем у *b*-формы; АТФ и Г6Ф не являются ингибиторами фосфорилазы *a*.

О роли АМР, P_i и АТФ в регуляции гликогенолиза можно ориентировочно судить по данным, приведенным на рис. 4.8; стационарные концентрации рассматриваемых соединений определяются восемью реакциями. Мышечное сокращение (реакция 1) приводит к снижению уровня АТФ и увеличению P_i , в то же время реакция 2 обеспечивает поддержание уровня АТФ. При гликогенолизе не только регенерируется АТФ, но одновременно в ходе реакций 4 и 5 потребляется P_i . В результате реакций 1 и 3 концентрации АМР и АТФ



Рис. 4.8. Реакции, определяющие уровни АТР, АМР и P_i в мышце. Ферменты: 1 — актомнозиновая АТРаза; 2 — креатинкиназа; 3 — аденилаткиназа; 4 — фосфорилаза; 5 — глицеральдегид-3-фосфат (ГЗФ)—дегидрогеназа; 6 — АМР-деаминаза; 7 — аденилосукцинат-синтетаза; 8 — аденилосукцинат.

изменяются в противоположных направлениях. Следовательно, увеличение концентраций P_i и АМР служит сигналом усиления гидролиза АТР и снижения его уровня, т. е. P_i и АМР являются активаторами гликогенолиза, основная функция которого состоит в образовании АТР. Напротив, АТР и Г6Ф служат ингибиторами гликогенолиза; при этом АТР выступает как классический ингибитор, действующий по принципу обратной связи; концентрация Г6Ф опосредованно отражает активность фосфофруктокиназы (ФФРК) — фермента, определяющего скорость гликолитического пути. Приведенные теоретические соображения не могут, однако, служить доказательством того, что рассматриваемые эффекторы являются регуляторами гликогенолиза *in vivo*.

Наиболее прямой путь выяснения роли АМР, P_i , АТР и Г6Ф — это определение их концентраций при различных состояниях метаболической активности. К сожалению, на этом пути встретились значительные трудности, которые рассматриваются в другой книге данной серии [23]. Главная проблема заключается в том, что классическими методами можно определить только «средние» концентрации метаболитов в интактной мышце. Поскольку каждая мышца состоит из многих тысяч миофибрилл (при этом имеется несколько

типов фибрилл), а каждая мышечная клетка содержит несколько субклеточных органелл, получаемые средние значения концентраций являются весьма ориентировочными и не дают представления о тех концентрациях, которые характерны для цитоплазмы, где функционирует фосфорилаза. Далее, классическими методами можно определить только суммарную концентрацию метаболита, в то время как необходимо знать концентрацию свободного, т. е. доступного для ферментов, метаболита. Последняя может значительно отличаться от суммарной вследствие связывания метаболита со специфическими макромолекулами; так, например, большая часть ADP в скелетной мышце связана с актином.

В последнее время появилась возможность определять концентрации свободных метаболитов в *интактных* тканях с помощью метода ядерного магнитного резонанса [24, 25]. Эти исследования показали, что в покое мышце концентрации «свободных» P_i , ADP и AMP, вероятно, значительно ниже, чем те, которые получены с помощью классических методов; это позволяет понять, почему в покое мышце фосфорилаза *b* практически неактивна ($<0,1\%$ максимальной потенциальной активности).

О важной роли изменения концентраций субстратов и (или) эффекторов для активирования гликогенолиза при сокращении свидетельствуют эксперименты двух типов. Было установлено, что при перфузии покоей мышцы лягушки раствором адреналина (разд. 4.6) уровень фосфорилазы *a* повышается до 50% , в то время как гликогенолиз ускоряется только в 10 раз; это показывает, что в данных условиях эффективность функционирования фосфорилазы *a* составляет только 1% от максимально возможной. В то же время при стимуляции мышцы электрическими импульсами определенной частоты, когда содержание фосфорилазы *a* увеличивается только до 10% , гликогенолиз ускоряется в 100 раз (рис. 4.3) [12, 26, 27]. Наиболее простое объяснение этого «противоречия» состоит в том, что в сокращающейся мышце отношение $(P_i + AMP)/(ATP + Г6Ф)$ значительно больше,

чем в покаящейся. Принимая во внимание, что сродство фосфорилазы *a* к АМР существенно выше, чем фосфорилазы *b*, а концентрация фосфорилазы в скелетной мышце (0,08 мМ) выше, чем концентрация АМР, можно сделать вывод, что *in vivo* АМР активирует в основном *a*-форму.

Второй эксперимент был проведен на мышцах линии I, у которых отсутствует киназа фосфорилазы и, следовательно, не происходит превращения фосфорилазы *b* в *a* (рис. 4.4). У этих мышей в отличие от нормальных при электростимуляции с частотой, вызывающей тетанус, ускорение гликолиза происходит не сразу, а после лаг-периода продолжительностью несколько секунд; оно может достигать 50% от максимальной скорости, наблюдаемой у нормальных мышей [13]. Эти данные позволяют сделать следующие заключения.

1. Фосфорилаза *b* может активироваться *in vivo* (по-видимому, в результате взаимодействия с АМР), если не происходит ее превращения в фосфорилазу *a*.

2. При сокращении мышц у мышей I-линии значительное увеличение концентрации АМР и (или) P_i должно происходить в течение нескольких секунд.

3. Наблюдаемый перед ускорением гликогенолиза лаг-период представляет собой время, необходимое для увеличения концентраций АМР и P_i в результате реакций 1—3 (рис. 4.8) до уровня, при котором происходит активация фосфорилазы *b*.

4. Отсутствие лаг-периода у нормальных мышей убедительно свидетельствует в пользу предположения о том, что в норме гликогенолиз в скелетной мышце запускается в результате образования фосфорилазы *a* и что *in vivo* последняя активируется при более низкой величине отношения $(\text{АМР} + P_i) / (\text{АТР} + \text{Г6Ф})$, чем *b*-форма. Мыши линии I не проявляют особых аномалий; они, например, способны плавать столь же долго, как и нормальные мыши. Для мышей, содержащихся в лабораторных условиях, способность к деградации гликогена без лаг-периода и с несколько большей скоростью не особенно важна, однако в естественных условиях она может давать большие преимущества, на-

пример при ловле добычи и бегстве от хищников.

Возможно, АМР выполняет еще одну функцию, поскольку *in vivo* он тормозит превращение фосфоорилазы *a* в фосфоорилазу *b* ($K_1 \cong 0,01$ мМ); торможение обусловлено связыванием АМР не с протеинфосфатазой-1, а с самой фосфоорилазой *a* [28]. Это новая, ранее не рассматривавшаяся в данной книге форма регуляции, при которой аллостерический эффектор ингибирует действие фермента, изменяя конформацию его *субстрата*. АМР, следовательно, не только непосредственно активирует фосфоорилазу, но и способствует поддержанию более высокого стационарного уровня фосфоорилазы *a*. Такой тип регуляции наблюдается у ряда ферментов, подвергающихся фосфорилированию — дефосфорилированию; он является весьма важным, поскольку обеспечивает действие аллостерического эффектора на двух уровнях.

4.6. Регуляция гликогенолиза адреналином

4.6.1. Открытие циклического АМР [29]

Хотя активация гликогенолиза адреналином в скелетной мышце и печени была обнаружена еще в 1920 г., механизм действия этого, а также и других гормонов долгое время оставался практически неизвестным. Объяснялось это тем, что действие гормона удавалось обнаружить только на интактном животном. Однако в начале 50-х годов Э. Сазерленд показал, что при инкубации срезов печени с адреналином происходит усиление гликогенолиза и фосфоорилазной активности; это было первым сообщением о влиянии гормона на активность определенного фермента. После гомогенизации срезов печени ответ на адреналин исчезал. Установление химической природы процессов, обуславливающих изменение фосфоорилазной активности (реакции фосфорилирования и дефосфорилирования фермента), привело к предположению, что для активации фосфоорилазы адреналином необходимы АТФ и Mg^{2+} . Действительно, при добавлении этих компонентов к гомогенизированным клеткам пе-

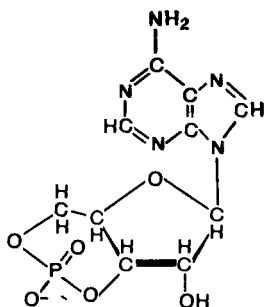


Рис. 4.9. Структурная формула сАМР.

чени чувствительность к адреналину восстанавливалась. Обнаружение действия гормона на препарате разрушенных клеток явилось крупным достижением и позволило выделить две стадии процесса. На первой стадии адреналин действует на мембранную фракцию клеток, в результате чего образуется низкомолекулярный термостабильный фактор; на второй стадии этот фактор, заменяя собою гормон, увеличивает долю фосфорилазы *a*.

Низкомолекулярный фактор был идентифицирован как аденозин-3',5'-циклический монофосфат (сАМР) (рис. 4.9). Он образуется из АТР при участии фермента, названного аденилатциклазой; другим продуктом реакции является пирофосфат. сАМР гидролизуетсЯ с образованием АМР одной или несколькими сАМР-фосфордиэстеразами. В состав активируемой адреналином аденилатциклазы входят по крайней мере три белка; все они локализованы в плазматической мембране, которая окружает каждую мышечную клетку и клетку печени [30]. Первый белок — это β -рецептор (*R*), который связывает адреналин; второй — регуляторная субъединица (*G_s*), связывающая гуаниновые нуклеотиды; третий белок — каталитическая субъединица (*C*) аденилатциклазы. Эта трехкомпонентная система схематически изображена на рис. 4.10. Изолированная каталитическая субъединица аденилатциклазы практически неактивна; она становится активной при взаимодействии с *G_s* (ин-

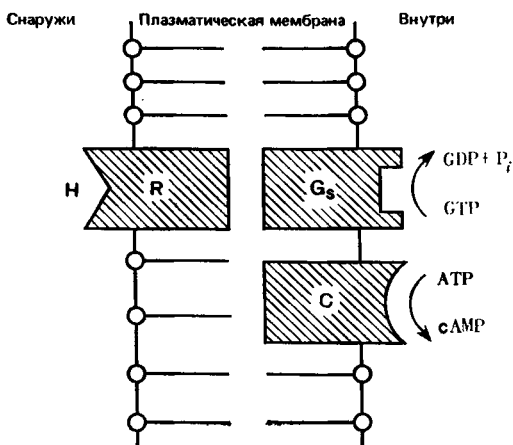


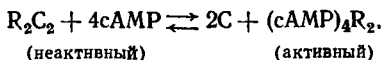
Рис. 4.10. Трехкомпонентная модель аденилатциклазы [31]. Н — гормон, например адреналин; R — рецептор гормона; G_s — белок, связывающий гуаниновый нуклеотид; С — каталитическая субъединица аденилатциклазы.

декс «s» — от слова stimulatory — стимулирующая) при условии, что этот белок связал GTP. Однако белок G_s при взаимодействии с субъединицей С приобретает GTPазную активность и гидролизует связанный GTP до $GDP + P_i$; в результате активация белка С прекращается, поскольку комплекс G_s-GDP не способен его активировать. Предполагается, что комплекс адреналин— β -рецептор активирует белок С, ускоряя регенерацию G_s-GTP из G_s-GDP . Следовательно, аденилатциклазную систему можно сравнить с аллостерическим ферментом, у которого β -рецептор и G_s -белок являются регуляторными субъединицами, а адреналин и GTP — аллостерическими активаторами; при этом субъединицы фиксированы и определенным образом ориентированы в плазматической мембране. В результате взаимодействия адреналина с β -рецептором (на наружной стороне мембраны) внутри клетки образуется cAMP. Следует отметить, что на рис. 4.10 приведена лишь общая схема рассматриваемой системы. Известно, что компоненты R, G_s и С представлены

в комплексе не в эквимольных соотношениях: молярное содержание G_s значительно выше, чем R и C . Это позволяет предположить, что одна молекула β -рецептора может активировать несколько молекул G_s [32]. Более подробно некоторые аспекты взаимодействия гормонов с аденилатциклазной системой рассматриваются в следующей главе (разд. 5.4).

4.6.2. Действие сАМР на гликогенолиз

Открытие способности сАМР стимулировать превращение фосфорилазы b в фосфорилазу a указывало на то, что это действие обусловлено либо активированием киназы фосфорилазы, либо ингибированием протеинфосфатазы-1. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что *in vivo* для регуляции гликогенолиза используются оба пути. сАМР передает гормональный сигнал, активируя фермент, называемый сАМР-зависимой протеинкиназой (сАМР-ПК) [4]. Этот фермент состоит из двух регуляторных (R) субъединиц, каждая из которых связывает две молекулы сАМР, и двух каталитических (C) субъединиц, в которых локализован активный центр [33]. При активации, осуществляемой сАМР, происходит диссоциация комплекса R_2C_2 :



Далее сигнал передается киназе фосфорилазы (см. разд. 4.4). Этот фермент представлен двумя формами — малоактивной дефосфорилированной b -формой (активность которой возрастает в 20—30 раз при взаимодействии с $TN-C$ в условиях микромолярной концентрации Ca^{2+}) и высокоактивной фосфорилированной a -формой (на активность которой $TN-C$ не влияет) [14, 15]. Превращение киназы фосфорилазы b в a катализируется сАМР-зависимой протеинкиназой; при этом происходит быстрое фосфорилирование одного остатка серина в β -субъединице и относительно медленное фосфорилирование остатка серина в α -субъединице. Активация обусловлена в основном фосфорилированием β -субъединицы [34], од-

нако небольшое дополнительное повышение активности вызывает и фосфорилирование α -субъединицы [35]. Оба остатка серина фосфорилируются *in vivo* при действии адреналина [34].

Для активности как *b*-формы, так и *a*-формы абсолютно необходим Ca^{2+} ; при насыщающей концентрации Ca^{2+} активность *a*-формы в 15 раз выше, чем *b*-формы; кроме того, величина K_a (для связывания Ca^{2+}) у *a*-формы в 10 раз меньше, чем у *b*-формы (рис. 4.5). Можно поэтому предполагать, что фосфорилирование α - и β -субъединиц не только увеличивает каталитическую активность γ -субъединицы; оно обеспечивает также возможность активации в условиях, когда в δ -субъединице (кальмодулине) занята только часть Ca^{2+} -связывающих участков. Полагают, что *a*-форма полностью активируется, если Ca^{2+} занимает только два высокоаффинных Ca^{2+} -связывающих участка; для активирования же *b*-формы должны быть заняты все четыре участка (рис. 4.6).

Протеинфосфатаза-1 (ПрФ-1) является не только главной фосфатазой, которая превращает фосфорилазу *a* в фосфорилазу *b*, но также главным ферментом, который дефосфорилирует β -субъединицу киназы фосфорилазы и гликогенсинтазу [36]. ПрФ-1 катализирует, следовательно, все реакции дефосфорилирования, которые приводят к ингибированию гликогенолиза и активации синтеза гликогена (рис. 4.11). ПрФ-1 эф-

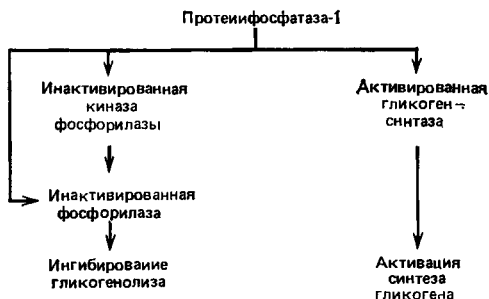


Рис. 4.11. Роль протеинфосфатазы-1 в регуляции метаболизма гликогена.



Рис. 4.12. сАМР-зависимая протеинкиназа может инактивировать протеинфосфатазу-1 путем фосфорилирования ингибитора-1.

фективно ингибируется белком, называемым ингибитором-1. Этот белок проявляет ингибирующее действие только после его фосфорилирования (по остатку треонина), которое осуществляет сАМР-протеинкиназа (сАМР-ПК) [37] (рис. 4.12). Ингибирование ПрФ-1 по данному пути имеет, вероятно, большое значение при адренергической регуляции метаболизма гликогена [38]. Регуляция активности ПрФ-1 ингибитором-1 позволяет объяснить, как в ответ на адреналин повышается уровень фосфоорилазы α (до 70%) даже в покоейшей мышце, в которой концентрация Ca^{2+} меньше или равна 0,1 мкМ и, следовательно, активность α -формы киназы фосфоорилазы составляет только несколько процентов от потенциально возможной (рис. 4.5).

4.7. Регуляция синтеза гликогена

Регуляция синтеза гликогена осуществляется на стадии переноса глюкозильных остатков от уридиндифосфатглюкозы (UDP-глюкозы) на гликоген, которая катализируется гликогенсинтазой. Хотя регуляция активности гликогенсинтазы путем фосфорилирования—дефосфорилирования была выявлена еще в начале 60-х годов [3], только недавно стало ясно, как сложна эта система. В гликогенсинтазе фосфорилируется семь остатков серина; в процессе участвует по крайней мере шесть протеинкиназ, и все семь остатков серина фосфорилируются *in vivo* [39—42]. Поскольку фермент образован четырьмя идентичными субъедини-

цами ($M_r = 86\,000$), число возможных фосфорилированных форм очень велико. Распределение участков фосфорилирования по пептидной цепи показано на рис. 4.13. Участки 1a, 1b и 2 фосфорилируются сАМР-ПК, а участок 2 — киназой фосфорилазы, кальмодулин-зависимой киназой гликогенсинтазы и киназой-4 гликогенсинтазы (КГС-4). Участки (3a+3b+3c) фосфорилируются киназой-3 гликогенсинтазы (КГС-3), а участок 5 — киназой-5 гликогенсинтазы (КГС-5).

Фосфорилирование любого из участков приводит к уменьшению активности гликогенсинтазы, но в разной степени для разных участков. По мере увеличения степени фосфорилирования заметно повышается величина K_M для UDP-глюкозы [43], причем при фосфорилировании участков (3a+3b+3c) K_M увеличивается больше, чем при фосфорилировании участка 2 или 1a. Эти эффекты аддитивны, и при фосфорилировании всех пяти участков наблюдается значительное увеличение K_M . Влияние фосфорилирования может компенсироваться аллостерическим активатором глюкозо-6-фосфатом (Г6Ф), который снижает K_M для UDP-глюкозы. Важно отметить, что при фосфорилировании увеличивается K_a для Г6Ф и уменьшается K_i для ингибиторов (например, P_i), которые выступают в качестве антагонистов активатора Г6Ф).

При фосфорилировании участков 1b и 5 кинетические свойства гликогенсинтазы существенно не меняются.

4.7.1. Регуляция синтеза гликогена в период мышечного сокращения

В участке 2 гликогенсинтаза может быть фосфорилирована двумя Ca^{2+} , кальмодулин-зависимыми протеинкиназами. Одна из них — киназа фосфорилазы [44], а другая — особый фермент, который не способен превращать фосфорилазу *b* в *a* [42]. Эти данные показывают, что ионы кальция не только активируют гликогенолиз, но одновременно ингибируют синтез гликогена. При физиологических концентрациях фос-

фосфорилазы ($\cong 80$ мкМ) и гликогенсинтазы ($\cong 3$ мкМ) киназа фосфорилазы фосфорилирует преимущественно первый фермент. В связи с этим высказано предположение, что в период сокращения Ca^{2+} , кальмодулин-зависимая киназа гликогенсинтазы фосфорилирует участок 2 гликогенсинтазы, а киназа фосфорилазы атакует этот участок только после завершения превращения фосфорилазы *b* в *a* [42]. Однако еще не было показано, что при мышечном сокращении происходит увеличение степени фосфорилирования участка 2 *in vivo*. Если такое увеличение все-таки происходит, то ему может «противодействовать» увеличение скорости дефосфорилирования в результате уменьшения содержания гликогена (см. разд. 4.7.4).

4.7.2. Ингибирование синтеза гликогена адреналином [41]

Содержание фосфата в гликогенсинтазе в отсутствие адреналина составляет менее трех остатков на субъединицу, а при действии максимально эффективной дозы этого гормона — более пяти остатков. Фосфорилирование участков 1а и 1b увеличивается на 0,25 остатка на субъединицу, участка 2 — примерно на 0,6, а участков (3а+3b+3с) — на 1,2.

Следовательно, ингибирование гликогенсинтазы адреналином можно считать результатом увеличения степени фосфорилирования участков (3а+3b+3с) и в меньшей степени фосфорилирования участков 2 и 1а.

Влияние адреналина опосредованно; в качестве действующего агента выступает сАМР, однако последний не изменяет активности КГС-3. Следовательно, увеличение степени фосфорилирования участков (3а+3b+3с) обусловлено ингибированием протеинфосфатазы-1. Один из механизмов такого ингибирования — это фосфорилирование ингибитора-1 (рис. 4.12). Кроме того, в условиях высокой концентрации фосфорилазы *a*, образовавшейся в ответ на действие адреналина, скорость дефосфорилирования гликогенсинтазы снижается и в результате простой конкуренции за протеинфосфатазу-1. Ввиду более высокой concentra-

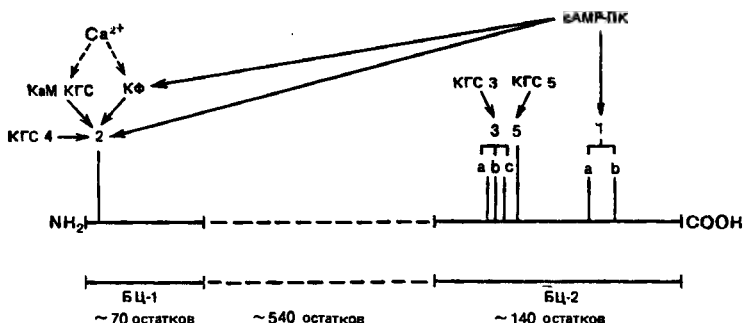


Рис. 4.13. Локализация участков фосфорилирования в гликогенсинтазе скелетной мышцы кролика. Участок 2 является седьмым остатком с N-конца белковой молекулы, а участки 3а, 3б, 3с, 5, 1а и 1б — соответственно 30, 34, 38, 46, 87 и 100 остатками с N-конца крупного бромцианового пептида (БЦ-2), локализованного в С-концевой части молекулы [40]. Сокращения: сАМР-ПК — сАМР-зависимая протеинкиназа; КФ — киназа фосфорилазы; КГС — киназа гликогенсинтазы; КаМ — кальмодулин.

ции фосфорилазы (80 мкМ) в скелетной мышце по сравнению с концентрацией гликогенсинтазы (3 мкМ) такой дополнительный механизм может иметь существенное значение.

Вероятно, фосфорилирование участков 1а и 1б катализирует сАМР-ПК, а увеличение степени фосфорилирования участка 2 может быть обусловлено разными причинами: либо прямым действием сАМР-ПК, либо опосредованным действием сАМР-ПК путем активации киназы фосфорилазы (рис. 4.13), либо ингибированием протеинфосфатазы-1, либо, наконец, комбинацией этих механизмов.

4.7.3. Стимуляция синтеза гликогена инсулином [45]

Инсулин стимулирует синтез гликогена в скелетной мышце, вызывая дефосфорилирование и активацию гликогенсинтазы; это действие инсулина не связано с его влиянием на транспорт глюкозы [46]. Активация гликогенсинтазы *in vivo* происходит относительно

быстро, за несколько минут, а при действии адреналина этот процесс длится несколько секунд. Инсулин эффективен в присутствии пропранолола (который блокирует действие адреналина); действие инсулина не сопровождается изменением концентрации сАМР.

В условиях максимально эффективных доз инсулина содержание фосфата в гликогенсинтазе снижается примерно на 0,5 остатков на субъединицу; это снижение обусловлено специфическим дефосфорилированием участков (3a+3b+3c). Инсулин, следовательно, должен либо уменьшать активность КГС-3, либо активировать протеинфосфатазу (или фосфатазы), которая дефосфорилирует участки (3a+3b+3c). В скелетной мышце имеются два фермента, способные дефосфорилировать эти участки *in vitro*: протеинфосфатаза-1 и протеинфосфатаза-2A; первая из них является доминирующей [36]. Тем не менее *in vitro* фосфатазы не проявляют специфичности к участкам (3a+3b+3c), и участок 2 дефосфорилируется примерно с такой же скоростью. Эти данные свидетельствуют, что активация гликогенсинтазы инсулином осуществляется путем специфического ингибирования КГС-3. Возможный механизм ингибирования рассматривается в разд. 4.11.

4.7.4. Роль Г6Ф и гликогена в регуляции активности гликогенсинтазы

Глюкоза, транспортируемая в скелетную мышцу при действии инсулина, немедленно превращается в Г6Ф, который в покоей мышце идет в основном на синтез гликогена. Таким образом, инсулин не только вызывает дефосфорилирование гликогенсинтазы, приводящее к снижению K_M для UDP-глюкозы, но и увеличивает концентрацию Г6Ф, что обуславливает дальнейшее снижение K_M для UDP-глюкозы. Дефосфорилирование снижает также K_a для Г6Ф и тем самым усиливает действие этого эффектора. Активация гликогенсинтазы Г6Ф служит примером регуляции по типу «опережающей» связи, при которой метаболит, образующийся на предшествующей стадии, повышает

активность фермента, находящегося на последующей стадии.

Степень фосфорилирования гликогенсинтазы в скелетной мышце увеличивается при возрастании содержания гликогена (и наоборот) [47], т. е. в данном случае контроль осуществляется по типу обратной связи, поскольку гликоген регулирует скорость собственного синтеза. Однако молекулярный механизм этого эффекта пока не выяснен; *in vitro* в опытах с протеинкиназой или с протеинфосфатазой гликоген непосредственно не оказывает влияния на скорость фосфорилирования или дефосфорилирования гликогенсинтазы [45, 48].

4.7.5. Роль участка 5 [48]

Фосфорилирование участка 5 киназой КГС-5, по-видимому, не приводит к изменению кинетических свойств гликогенсинтазы; *in vivo* этот участок почти полностью фосфорилирован, что безусловно имеет биологическое значение [41, 45]. Недавно было показано, что фосфорилирование участков (3a+3b+3c) киназой КГС-3 происходит только в том случае, когда предварительно фосфорилирован участок 5. КГС-5 является, вероятно, первым примером протеинкиназы, биологическая роль которой заключается в образовании участка узнавания для другой протеинкиназы.

4.8. сАМР и действие гормонов

Открытие сАМР решило две проблемы в изучении механизма действия гормонов. Во-первых, стало ясно, каким образом гормоны вызывают специфический эффект, не проникая в клетку, метаболическую активность которой они регулируют. Во-вторых, образование сАМР в микромолярных концентрациях в ответ на увеличение уровня гормонов в крови в пределах наномолярных (или ниже) концентраций объяснило высокую биологическую активность гормонов.

Образование сАМР в ответ на действие адреналина происходит не только в скелетной мышце или в пе-

чени, оно наблюдается также во многих тканях при взаимодействии различных гормонов с соответствующими рецепторами. В клетках, в которых два или несколько гормонов стимулируют аденилатциклазу, каждый гормон-рецепторный комплекс действует по механизму, показанному на рис. 4.10 [29]. сАМР, следовательно, можно считать общим медиатором действия гормонов, и его идентификация относится к крупнейшим открытиям в области биологии в нашем веке (Э. Сазерленд, Нобелевская премия 1971 г.).

В клетках млекопитающих сАМР-ПК является одним из двух ферментов (кроме него еще сАМР-фосфодиэстераза), которые связывают сАМР с высоким сродством; в различных тканях, даже в тех, в которых метаболизм гликогена имеет очень небольшое значение, свойства сАМР-ПК сходны. В связи с этим выдвинута гипотеза, согласно которой специфичность действующих «через сАМР» гормонов определяется наличием соответствующих рецепторов в плазматической мембране клеток-мишеней и природой физиологических субстратов для сАМР-ПК в этих клетках [49, 50] (рис. 4.14).

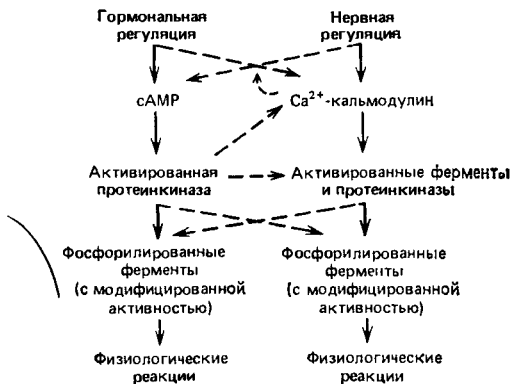


Рис. 4.14. Молекулярные механизмы нервной и гормональной регуляции активности клеток при участии сАМР и кальмодулина. Пунктирные линии показывают некоторые стадии, на которых сАМР- и Ca^{2+} -кальмодулиновая системы могут действовать параллельно [9].

На примере метаболизма гликогена хорошо видно, что если в качестве субстратов выступают ферменты, то фосфорилирование часто приводит к изменению K_m для субстрата, K_a — для активатора и K_i — для ингибитора. Субстраты, активаторы и ингибиторы могут в свою очередь влиять на скорость реакций фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов, усиливая или ослабляя таким образом эффективность ковалентной модификации. Процессы фосфорилирования—дефосфорилирования, влияние аллостерических эффектов и наличие определенных субстратов в совокупности обеспечивают интеграцию внеклеточной (нервной и гормональной) и внутриклеточной информации, что и обуславливает необходимую *in vivo* активность соответствующего метаболического пути. Степень влияния фосфорилирования на активность определенного фермента *in vivo* зависит от метаболического состояния клетки. Некоторые ферменты, являющиеся субстратами сАМР-ПК, рассмотрены ниже.

4.8.1. Мобилизация триглицеридов и эфиров холестерина

В ответ на действие гормонов адреналина и глюкагона триглицериды, находящиеся в жировой ткани, гидролизуются до жирных кислот и глицерина. Таким образом в периоды стресса или голодания мобилизуются энергетические резервы (разд. 4.8.2). Действие гормонов опосредуется сАМР-ПК, которая катализирует фосфорилирование триглицеридлипазы и тем самым активирует ее [51].

Эфиры холестерина в коре надпочечников гидролизуются в ответ на действие адренокортикотропного гормона (АКТГ); при этом образуется холестерол, необходимый для биосинтеза ряда стероидных гормонов, например кортизола. Гидролиз эфиров холестерина происходит также в желтом теле яичника в ответ на действие лютеинизирующего гормона (ЛГ). Таким образом обеспечивается поступление холестерина для биосинтеза стероидных гормонов — прогестерона и эстрадиола. Оба этих процесса запускаются с по-

мощью сАМР-ПК, которая катализирует фосфорилирование (активирование) гидролазы эфиров холестерина [52].

Интересно отметить, что триглицеридлипаза жировой ткани и гидролаза эфиров холестерина в коре надпочечников и в желтом теле яичника — идентичные ферменты [53]. В данном случае ответ на действие гормонов обусловлен не только типом рецептора и фосфорилируемого фермента, но и природой субстрата гидролазы в клетке-мишени.

4.8.2. Регуляция образования глюкозы в печени млекопитающих глюкагоном

Глюкагон — гормон, секретируемый α -клетками поджелудочной железы при пониженном содержании глюкозы в крови (т. е. при голодании); он повышает уровень глюкозы в крови, стимулируя гликогенолиз и глюконеогенез в печени. Мобилизация гликогена в печени осуществляется таким же путем, как и при действии адреналина в скелетной мышце, т. е. в результате стимуляции гликогенолиза. Стимуляция глюконеогенеза также опосредована участием сАМР-ПК и включает фосфорилирование 6-фосфофрукто-2-киназы (ФФрК-2), фруктозо-2,6-бисфосфатазы (Фр2,6Фаза) и пируваткиназы.

ФФрК-2 и Фр2,6Фаза — ферменты, участвующие в образовании фруктозо-2,6-бисфосфата (Фр2,6Ф) и его дефосфорилировании. Это соединение было открыто только в 1980 г. [54]; оно представляет собой мощный аллостерический активатор 6-фосфофрукто-1-киназы (ФФрК-1) и одновременно ингибитор фруктозо-1,6-бисфосфатазы (Фр1,6Фазы). Фр2,6Ф активирует ФФрК-1, снижая K_m для фруктозо-6-фосфата и увеличивая K_i для АТФ, и ингибирует Фр1,6Фазу, увеличивая K_m для фруктозо-1,6-бисфосфата. В обоих случаях Фр2,6Ф действует синергично сАМР, который также является аллостерическим активатором ФФрК-1 и ингибитором Фр1,6Фазы (рис. 4.15).

В результате действия глюкагона, опосредованного сАМР-ПК, происходит ингибирование ФФрК-2, акти-

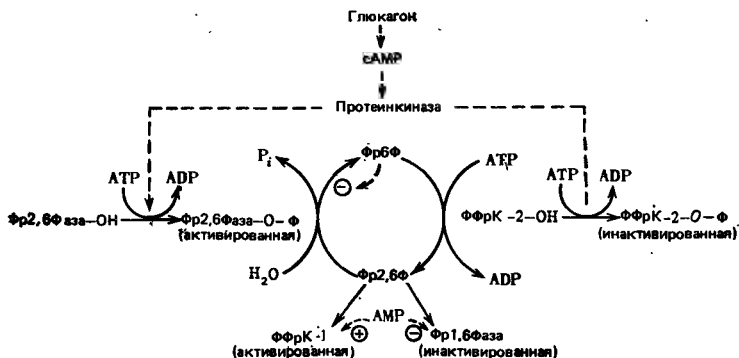


Рис. 4.15. Синтез и деградация Фр2,6Ф в печени; регуляция этих процессов глюкагоном и метаболитами; Фр2,6Ф — фруктозо-6-фосфат; (—) — ингибирование; (+) — активация.

вазия Фр2,6Фазы, и внутриклеточное содержание Фр2,6Ф быстро падает (рис. 4.15). Это в свою очередь приводит к ингибированию ФФрК-1 и активации Ф1,6Фазы, в результате чего стимулируется глюконеогенез и становится возможным превращение гликогена в глюкозу, а не в продукты гликолитического пути.

Образование и разрушение Фр2,6Ф катализируется бифункциональным ферментом, имеющим обе активности — ФФрК-2 и Фр2,6Фазу. Фосфорилирование определенного остатка приводит к ингибированию ФФрК-2 и активации Фр2,6Фазы [55]. Эта ситуация не уникальна. Например, показано, что протеинкиназа и фосфатаза, вызывающие инактивацию и реактивацию изоцитратдегидрогеназы у *E. coli* (катализирующей важную реакцию глиоксилатного цикла), сформирован одной полипептидной цепью [56]. У *E. coli* известен еще один бифункциональный фермент, катализирующий аденилирование и деаденилирование глутаминсинтетазы (гл. 5). Подобная ситуация благоприятна в отношении регуляции, поскольку ферменты, катализирующие «противоположные» реакции, могут регулироваться реципрокно либо путем фосфорилирования, либо с помощью аллостерических эффекторов. Например, фруктозо-6-фосфат — субстрат

ФФрК-2 ингибирует Фр2,6Фазу (рис. 4.15); активность этих двух ферментов регулируется также другими метаболитами [54].

Пируваткиназа катализирует последнюю необратимую реакцию гликолиза, в результате которой из фосфоенолпирувата (ФЕП) и АДФ образуются пируват и АТФ. В процессе глюконеогенеза ФЕП синтезируется из пирувата через оксалоацетат в результате действия двух митохондриальных ферментов — пируваткарбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы. Так как максимальная активность пируваткиназы очень высока (по сравнению с активностью ферментов глюконеогенеза), она должна эффективно регулироваться. Зависимость активности пируваткиназы от концентрации ФЕП имеет сигмоидный характер (рис. 4.16). АТФ и некоторые аминокислоты, например аланин и фенилаланин, конкурируют с ФЕП, смещая кривую вправо; при этом ее сигмоидность становится более выраженной. Действие Фр1,6Ф вызывает смещение кривой влево, а по форме она в этом случае приближается к

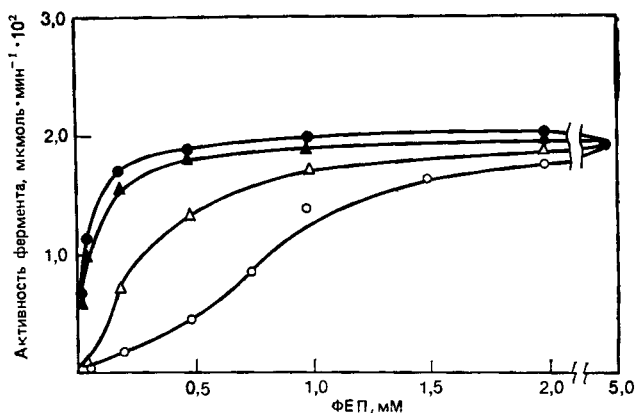


Рис. 4.16. Зависимость активности пируваткиназы печени крысы от концентрации ФЕП.

Белые и черные символы обозначают активность фермента в отсутствие и в присутствии Фр-1,6-Ф₂ (5 мкМ) соответственно. Δ—Δ, ▲—▲ нефосфорилированная пируваткиназа; ○—○, ●—● фосфорилированная пируваткиназа [57].

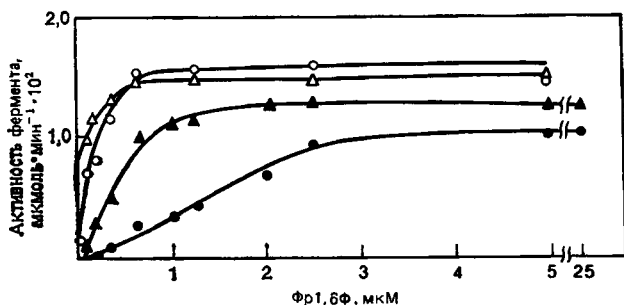


Рис. 4.17. Зависимость активности пируваткиназы печени крысы от концентрации Фр1,6Ф в присутствии (черные символы) и в отсутствие (белые символы) АТР (1,5 мМ) и аланина (0,5 мМ). Концентрация ФЕП — 0,2 мМ, $\triangle$ — $\triangle$, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ — нефосфорилированный фермент; $\circ$ — $\circ$, $\bullet$ — $\bullet$ — фосфорилированный фермент [57].

гиперболе; в результате эффективность действия фермента при низких концентрациях ФЕП становится значительно большей. Аналогичные соотношения были описаны в гл. 2 для треониндезаминазы и АТКазы. Регуляция пируваткиназы с помощью Фр1,6Ф служит еще одним примером активации по типу «опережающей» связи. Таким образом, ингибирование ФФрК-1 и активация Фр1,6Фазы, происходящие в ответ на действие глюкагона, снижают концентрацию Фр1,6Ф, что в свою очередь приводит к уменьшению активности пируваткиназы. Этот эффект усиливается при фосфорилировании пируваткиназы, что сопровождается увеличением K_M для ФЕП и K_a для Фр1,6Ф (рис. 4.17) и снижением K_i для АТР и аланина [57].

Аланин, фенилаланин и другие аминокислоты выступают как потенциальные ингибиторы пируваткиназы, поскольку они являются предшественниками глюкозы в процессе глюконеогенеза. сАМР-ПК фосфорилирует и активирует фенилаланингидроксилазу — первый фермент на пути деградации фенилаланина и тирозина, ведущем к образованию глюконеогенных предшественников.

4.8.3. Синтез и окисление жирных кислот в печени

После приема пищи (низкая величина отношения глюкагон/инсулин) глюкоза в цитоплазме превращается в пируват, а затем в митохондриях через ацетил-СоА — в цитрат. Это соединение транспортируется обратно в цитоплазму и расщепляется там до ацетил-СоА; далее происходит синтез длинноцепочечных жирных кислот. Процесс начинается с превращения ацетил-СоА в малонил-СоА, катализируемого ацетил-СоА—карбоксилазой. Для функционирования данного фермента абсолютно необходим цитрат [58] — это еще один пример активации по типу опережающей связи, аналогичный рассмотренным выше примерам регуляции гликогенсинтазы с помощью Г6Ф или пируваткиназы с помощью Фр1,6Ф.

В состоянии насыщения окисление жирных кислот, по-видимому, прекращается, поскольку уровень малонил-СоА повышается, а это соединение является эффективным ингибитором карнитин-ацилтрансферазы-1 (КАТ). КАТ-1 локализована на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий и катализирует образование жирнокислотных эфиров карнитина. Это первая стадия в транспорте жирных кислот в митохондриальный матрикс, где они подвергаются окислению [59].

В состоянии голода (высокая величина отношения глюкагон/инсулин) ацетил-СоА—карбоксилаза фосфорилируется сАМР-ПК, что приводит к снижению $V_{\max}$ и увеличивает K_a для цитрата [9, 58]. Это снижает синтез малонил-СоА (и длинноцепочечных жирных кислот) и, следовательно, ослабляет ингибирование КАТ-1; в результате жирные кислоты (образующиеся в основном при гидролизе триглицеридов в жировой ткани; разд. 4.8.1) окисляются до ацетил-СоА.

Хотя в состоянии голода превращение глюкозы в пируват заторможено вследствие ингибирования ФФрК-1 и пируваткиназы, пируват образуется в значительном количестве в результате распада глюкогенных аминокислот, например аланина и серина, а так-

же из лактата. Образованию ФЕП способствуют два обстоятельства. Во-первых, при ускорении превращения жирных кислот в ацетил-СоА в митохондриях повышаются величины отношений ацетил-СоА/СоА и NADH/NAD, что приводит к активации киназы пируватдегидрогеназы. Это вызывает фосфорилирование пируватдегидрогеназного комплекса (по трем остаткам серина) и переводит его в неактивное состояние [60, 61]. Во-вторых, ацетил-СоА является аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы.

4.8.4. Регуляция сокращений сердечной мышцы адреналином

Весьма вероятно, что реакции фосфорилирования—дефосфорилирования играют роль в регуляции таких процессов, как мышечное сокращение, секреция, транспорт веществ через мембраны, передача нервных импульсов и сенсорное восприятие, рост и дифференцировка, индукция синтеза белков и их деградация. Исследования соответствующих регуляторных механизмов осложняются отсутствием достаточно полных данных о молекулярной природе самих процессов. Однако важная роль сАМР-ПК была показана в ряде случаев, например при регуляции адреналином сокращений сердечной мышцы.

Адреналин, как известно, увеличивает силу и частоту сердечных сокращений, а также скорость расслабления. Эти эффекты связаны с изменением концентрации Ca^{2+} в цитозоле и фосфорилированием, осуществляемым сАМР-ПК [62, 63]. Фосфорилирование TN-I в мышце сердца снижает сродство TN-C к ионам Ca^{2+} , фосфорилирование *фосфоламбана* в саркоплазматическом ретикулуме сердечной мышцы увеличивает скорость поглощения Ca^{2+} пузырьками ретикулума, а фосфорилирование Ca^{2+} -АТРазы в плазматической мембране приводит к увеличению выхода кальция из цитозоля во внеклеточное пространство. Эти три реакции, по-видимому, лежат в основе увеличения скорости расслабления сердечной мышцы под влиянием адреналина.

Увеличение силы и частоты сокращения достигается в результате сАМР-зависимого фосфорилирования одного или нескольких белков в плазматической мембране. Это приводит к активации (в 3—4 раза) «медленных» Ca^{2+} -каналов и к увеличению скорости притока Ca^{2+} в клетки сердечной мышцы из внеклеточного пространства [63].

4.8.5. Субстратная специфичность сАМР-ПК [34, 64, 65]

Число физиологических субстратов сАМР-ПК достаточно велико, однако этот фермент весьма специфичен, поскольку с высокой скоростью фосфорилирует лишь небольшое число белков. Даже в случае физиологических субстратов фосфорилированию подвергаются один или два остатка из большого числа потенциально доступных остатков серина и треонина. Природа специфичности фермента стала яснее после того, как было установлено, что участкам фосфорилирования обычно предшествуют две расположенные рядом основные аминокислоты (табл. 4.1). Эта структурная особенность, как теперь известно, необходима для распознавания участка фосфорилирования.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что белки могут приобретать «чувствительность» к гормонам в результате очень немногочисленных мутаций. Так, например, если в результате мутаций в белке по соседству окажутся два остатка аргинина и они будут находиться рядом с остатками серина или треонина (в направлении N-конца), локализованными в доступной области поверхности белковой молекулы, то остатки серина или треонина будут фосфорилироваться *in vivo* сАМР-ПК. Если влияние фосфорилирования на функцию белка биологически выгодно, то мутация сохранится и распространится во всей популяции.

4.9. Кальмодулин и регуляция функции клеток [9, 18]

В результате нервной и гормональной регуляции в различных клетках наблюдается временное повыше-

Таблица 4.1. Аминоконсультные последовательности в окрестности участков фосфорилирования некоторых субстратов сАМР-зависимой протеинкиназы [67]

Субстрат	Источник	Последовательность
Киназа фосфорилазы (α -субъединица)	Мышца кролика	<u>Phe-Arg-Arg-Leu-Ser (P)-Ile</u>
Гликогенсинтаза (участок 1a)	То же	<u>Gln-Trp-Pro-Arg-Arg-Ala-Ser (P)-Cys</u>
Пируваткиназа	Печень крысы	<u>Gly-Tyr-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser (P)-Val</u>
Ингибитор-1	Мышца кролика	<u>Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Pro-Thr (P)-Pro</u>
Киназа фосфорилазы (β -субъединица)	То же	<u>Arg-Thr-Lys-Arg-Ser-Gly-Ser (P)-Val</u>
Гликогенсинтаза (участок 1b)	»	<u>Gly-Ser-Lys-Arg-Ser-Asn-Ser (P)-Val</u>
Фенилаланин-гидроксилаза	Печень крысы	<u>Ser-Arg-Lys-Leu-Ser (P)-Asn</u>
Тропонин-1	Сердце кролика	<u>Val-Arg-Arg-Ser (P)-Asp</u>

ние концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Этот эффект может быть обусловлен либо ускорением притока Ca^{2+} через плазматическую мембрану (разд. 4.8.5), либо мобилизацией его из внутриклеточных структур, например митохондрий и саркоплазматического ретикула. Многие биологические функции ионов кальция осуществляются при участии кальмодулина (или структурно сходных белков, например TN-C) с помощью механизма, аналогичного механизму действия сАМР-ПК (рис. 4.14). Способность кальмодулина функционировать как Ca^{2+} -зависимый регулятор активности ферментов обусловлена конформационными изменениями, которые сопровождают связывание Ca^{2+} и приводят к образованию специфических доменов, обеспечивающих связывание кальмодулина со многими ферментами и их активацию (табл. 4.2). Помимо кина-

Таблица 4.2 Некоторые ферменты, активируемые кальмодулином [9]

Фермент	Основной источник
сАМР-фосфодиэстераза с высоким K_m	Мозг, сердце
Аденилатциклаза	Мозг
Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая АТРаза	Плазматическая мембрана эритроцитов и других клеток
NAD-киназа	Высшие растения (см. гл. 5)
Киназа фосфорилазы	Мышцы
Киназа легкой цепи миозина	»
Киназа фосфоламбана	Сердечная мышца
Киназа гидроксилазы триптофана/тирозина	Мозг
Протеинфосфатаза 2В	Мышцы, мозг

зы фосфорилазы и кальмодулин-зависимой киназы гликогенсинтазы (разд. 4.4) кальмодулин активирует ряд других протеинкиназ, в частности протеинкиназу, которая фосфорилирует одну из легких цепей миозина. Это служит необходимой предпосылкой для появления АТРазной активности актомиозина и сокращения гладкой, но не скелетной, мышцы. В скелетной мышце роль фосфорилирования легкой цепи менее ясна; воз-

можно, оно лежит в основе феномена «*последовательного усиления*», т. е. постепенного увеличения силы сокращений, наблюдаемого при повторных сокращениях и расслаблениях скелетной мышцы, вызываемых относительно редкими импульсами [67].

В сердечной мышце кальмодулин-зависимая протеинкиназа фосфорилирует фосфоламбан на участке, отличном от того, на котором действует сАМР-ПК. Тем не менее кальмодулин-зависимое фосфорилирование тоже связано с увеличением скорости поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом [63].

Кальмодулин-зависимая протеинкиназа нервной ткани фосфорилирует ферменты, участвующие в синтезе нейромедиаторов, — тирозингидроксилазу (дофамин и норадреналин) и триптофангидроксилазу (серотонин). Фосфорилированные формы ферментов взаимодействуют с белком-активатором, что стимулирует синтез нейромедиаторов [68].

Кальмодулин активирует также протеинфосфатазу (2В), фермент, широко распространенный в тканях млекопитающих; особенно велика его концентрация в мозге и скелетной мышце [36, 39]. Протеинфосфатаза (2В) состоит из двух субъединиц, А и В. Кальмодулин связывается с каталитической А-субъединицей; В-субъединица по своей структуре и способности связывать ионы Ca^{2+} напоминает кальмодулин и TN-C. Следовательно, этот фермент, так же как и киназа фосфорилазы (разд. 4.4), регулируется двумя разными, но структурно сходными Ca^{2+} -связывающими белками. Физиологическая роль кальмодулин-зависимой протеинфосфатазы в настоящее время не вполне ясна. Возможно, вместе с кальмодулин-зависимой сАМР-фосфодиэстеразой (табл. 4.2) они ослабляют сигнал сАМР по отношению к сигналу Ca^{2+} . В скелетной мышце это фосфатаза для α -субъединицы киназы фосфорилазы и ингибитора-1 наиболее активна (разд. 4.6) [36], однако неизвестно, являются ли указанные белки физиологическими субстратами.

сАМР и Ca^{2+} -кальмодулиновая системы не только формально сходны (рис. 4.14), но и тесно связаны функционально. Наличие в ряде тканей Ca^{2+} , кальмо-

дулин-зависимых аденилатциклазы и сАМР-фосфодиэстеразы свидетельствует, что именно Ca^{2+} регулирует внутриклеточный уровень сАМР. С другой стороны, цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} в некоторых тканях, например в сердечной мышце (разд. 4.8), может регулироваться сАМР-ПК. Этот фермент влияет также на активность некоторых кальмодулин-зависимых ферментов, например киназы фосфорилазы и киназы легкой цепи миозина гладкой мышцы [62, 70]. сАМР-ПК и Ca^{2+} , кальмодулин-зависимая протеинкиназа часто фосфорилируют одни и те же белки, но вследствие высокой специфичности протеинкиназ обычно по разным участкам; в качестве примеров можно привести гликогенсинтазу (рис. 4.13), фосфоламбан и тирозингидроксилазу [9].

Некоторые гормоны способны одновременно активировать пути, регулируемые сАМР и Ca^{2+} -кальмодулином. Например, адреналин связывается с рецепторами по крайней мере трех типов, называемыми β -, α_1 - и α_2 -рецепторами. Связывание с β - и α_2 -рецепторами приводит соответственно к активации (разд. 4.6) и ингибированию (гл. 3) аденилатциклазы. Связывание с α_1 -рецепторами приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} [71]. Соотношение β -, α_1 - и α_2 -рецепторов в плазматических мембранах клеток различных тканей неодинаково; даже в одной и той же ткани оно зависит от возраста, пола и вида животного. У неполовозрелых крыс стимуляция гликогенолиза адреналином в печени опосредуется сАМР через β -рецепторы, у взрослых самцов — Ca^{2+} через α_1 -рецепторы, у взрослых самок — обоими регуляторами — сАМР и Ca^{2+} [72]. С другой стороны, в печени человека, кролика и в скелетных мышцах млекопитающих стимуляция гликогенолиза представляет собой β -адренэргический эффект.

4.10. Синхронизация метаболических путей при действии нервных и гормональных стимулов

Как было установлено, в основе регуляции активности цитоплазматических ферментов лежит принцип,

согласно которому при фосфорилировании ферменты деградации активируются, а ферменты синтеза обычно инактивируются (табл. 4.3). Это позволяет одним и

Таблица 4.3. Активация ферментов деградации и ингибирование ферментов синтеза путем фосфорилирования

	Тип протеинкиназы			
	сАМР	Ca ²⁺ - каль- моду- лино- вая	другие	
<i>Активация путем фосфорилирования</i>				<i>Пути деградации</i>
Фосфорилаза	—	+	—	Гликогенолиз
Киназа фосфорилазы	+	—	—	»
Миозин	—	+	—	Гидролиз АТФ
Триглицеридлипаза	+	—	—	Липолиз
Холестеролэстераза	+	—	—	Гидролиз эфиров холесте- рола
Фенилаланингидро- ксилаза	+	—	—	Расщепление аромати- ческих аминокислот
<i>Инактивация путем фосфорилирования</i>				<i>Пути синтеза</i>
Гликогенсинтаза	+	+	+	Синтез гликогена
Ацетил-СоА — карбо- ксилаза	+	—	+	Синтез жирных кислот
Пируваткиназа (пе- чень)	+	—	—	Синтез АТФ или жир- ных кислот
Гидроксиметилглута- рил-СоА — редуктаза	—	—	+	Синтез холестерина
Аминоацил-РНК — синтетаза	—	—	+	Синтез белков

тем же протеинкиназам и фосфатазам (и соответствующим регуляторным ферментам) контролировать различные метаболические пути. Например, сАМР-зависимая протеинкиназа и Ca²⁺-кальмодулиновый комплекс (действующий через ряд протеинкиназ) влияют на активность как ферментов деградации, так и ферментов синтеза. Подобным же образом процессы дефосфорилирования, участвующие в регуляции метаболизма гликогена, гликолиза, глюконеогенеза, синтеза жирных кислот, синтеза холестерина и синтеза белков

(табл. 4.3), катализируются только тремя ферментами, а именно протеинфосфатазами 1, 2А и 2С [36]. Однако вследствие широкой специфичности данных ферментов *in vitro* их относительная роль в регуляции различных метаболических путей *in vivo* в большинстве случаев еще не выяснена полностью.

Следует подчеркнуть, что даже в том случае, когда два или несколько ферментов фосфорилируются одной протеинкиназой и дефосфорилируются одной фосфатазой, активности этих ферментов могут регулироваться независимо при изменении концентраций соответствующих субстратов и аллостерических эффекторов (разд. 4.8). Таким образом обеспечивается как синхронная, так и автономная регуляция активности различных ферментов.

4.11. Механизм действия инсулина

Известно, что инсулин вызывает дефосфорилирование и активацию гликогенсинтазы [45], гидроксиметилглутарил-СоА—редуктазы [73] и аминоксил-РНК—синтетазного комплекса [74]. Эти эффекты, вероятно, и объясняют (по крайней мере частично) способность инсулина стимулировать *in vivo* синтез гликогена, холестерина и белка. Поскольку приведенные выше ферменты биосинтеза регулируются протеинкиназами, на активность которых не влияют сАМР и кальмодулин (табл. 4.3), то возникает вопрос, участвуют ли эти киназы в действии инсулина на биосинтетические процессы.

Активация гликогенсинтазы инсулином в скелетной мышце, по-видимому, связана с ингибированием КГС-3 (разд. 4.7.3), однако молекулярный механизм этого процесса не ясен. Возможно, связывание инсулина с рецептором приводит к образованию медиатора (отличного от сАМР или Ca^{2+}), который ингибирует КГС-3. В последнее время накапливается все больше данных, что рецепторами некоторых гормонов, стимулирующих рост, например фактора роста эпидермиса (ФРЭ), а также инсулина служат протеинкиназы, которые активируются при взаимодействии с этими гормо-

нами [75, 76]. По-видимому, рецептор представляет собой трансмембранный белок, у которого участок, связывающий инсулин, локализован на наружной, а протеинкиназный центр — на внутренней поверхности плазматической мембраны. Взаимодействие гормона и рецептора генерирует протеинкиназную активность и, таким образом, приводит к фосфорилированию внутриклеточных белков, в частности КГС-3, без участия какого-либо внутриклеточного медиатора, например сАМР или Ca^{2+} .

Рецепторы инсулина и ФРЭ принадлежат к уникальному классу протеинкиназ, которые фосфорилируют остатки тирозина, а не серина или треонина. Это удивительно, поскольку доля фосфотирозинов составляет всего 0,03% от всех фосфорилируемых аминокислот в нормальной клетке, остальные 99,97% приходятся на фосфосерин и фосфотреонин. Незначительное количество фосфотирозина *in vivo* позволяет предполагать, что число субстратов тирозинкиназ весьма мало или же физиологические субстраты этих ферментов присутствуют в крайне малой концентрации.

В настоящее время известно, что влияние инсулина на такие процессы, как транспорт глюкозы и синтез гликогена в скелетной мышце или синтез жирных кислот в жировой ткани, не связано с участием сАМР. Тем не менее инсулин снижает *in vivo* уровень сАМР, если он оказался повышенным в результате действия соответствующих гормонов [29]. Этот факт очень важен для понимания метаболического действия инсулина. Данный гормон выступает антагонистом глюкагона при его действии на метаболические процессы в печени и антагонистом адреналина при действии последнего на триглицеридлипазу в жировой ткани (разд. 4.8). Однако вопрос о том, ингибирует ли инсулин аденилатциклазу, активирует ли сАМР-фосфодиэстеразу или же оказывает влияние на оба фермента, еще не решен; нет также единой точки зрения на молекулярный механизм процесса.

Инсулин вызывает усиление фосфорилирования некоторых белков по остаткам серина; отсюда следует, что по крайней мере одна протеинкиназа активируется

или одна протеинфосфатаза ингибируется инсулином. Может ли один и тот же механизм с участием инсулина приводить одновременно к увеличению и уменьшению фосфорилирования белков, пока не ясно.

Выяснение молекулярного механизма действия инсулина является центральной проблемой в области изучения гормональной регуляции клеточного метаболизма. Альтернативные представления по вопросу о действии инсулина рассмотрены в работе [78].

4.12. Заключение

Циклический переход ферментов, катализирующих ключевые стадии метаболизма, из фосфорилированных форм в дефосфорилированные представляет собой исключительно эффективный механизм обратимого изменения их активности. Установлено, что в клетках млекопитающих этот механизм распространен почти так же, как аллостерическая регуляция. Поскольку реакции фосфорилирования и дефосфорилирования катализируются разными модифицирующими ферментами и осуществляются при действии одного фермента на другой, их можно рассматривать как *каскадные* системы [79]. В *моноциклических каскадах* аллостерические эффекторы могут связываться либо с «обратимо модифицируемым» ферментом, либо с одним или обоими модифицирующими ферментами. В процессе этих взаимодействий изменение концентрации одного или нескольких эффекторов будет автоматически изменять относительные активности модифицирующих ферментов, определять стационарный уровень фосфорилирования и активности обратимо модифицируемого фермента. Следовательно, моноциклические каскады действуют как метаболические интегрирующие системы, которые могут реагировать на изменение концентраций различных метаболитов. Теоретический анализ показывает, что моноциклические каскадные системы имеют ряд свойств, потенциально важных для клеточной регуляции [79].

1. Они обладают большими возможностями *усиления сигнала*; это позволяет им изменять степень фос-

фосфорилирования обратимо модифицируемого фермента в ответ на очень небольшие изменения концентрации аллостерического эффектора.

2. Они способны функционировать как *«усилители скорости»*, отвечая на изменение концентрации аллостерического эффектора в течение миллисекунд.

3. Они могут проявлять значительную гибкость при формировании ответной реакции в зависимости от того, что происходит с модифицирующим ферментом: активирует или ингибирует его аллостерический эффектор, связывается ли этот эффектор с обратимо модифицируемым ферментом, изменяя скорость его фосфорилирования и (или) дефосфорилирования. В условиях, когда аллостерический эффектор активирует один модифицирующий фермент и ингибирует другой [например, сАМР активирует сАМР-ПК и вызывает ингибирование протеинфосфатазы-1 в результате фосфорилирования ингибитора-1 при действии сАМР-ПК (рис. 4.12)], способность усиливать сигнал значительно увеличивается; при этом наблюдается *сигмоидная* зависимость между стационарным уровнем фосфорилирования *обратимо* модифицируемого фермента и концентрацией эффектора. Известно, что обратимо модифицируемые ферменты часто фосфорилируются по нескольким определенным участкам одной протеинкиназой или по ряду участков разными протеинкиназами (как, например, в случае гликогенсинтазы); это обеспечивает дополнительные возможности для регуляции в каскадной системе, поскольку фосфорилирование по *нескольким* участкам может оказывать синергическое действие на кинетические параметры, а также влиять на регуляцию процесса дефосфорилирования.

Если активная форма обратимо модифицируемого фермента одного каскада служит модифицирующим ферментом другого каскада, в котором происходит фосфорилирование—дефосфорилирование, эти два каскада оказываются сопряженными и образуют *бициклический каскад*. Это значительно повышает гибкость ответной реакции, а также способность к усилению сигнала и увеличению скорости ответной реакции.

Моно-, би- и полициклические каскады выполняют еще две функции. Во-первых, они могут объединять два (или более) ферментов, внутриклеточная концентрация которых сильно различается. Такая связь повышает усиливающий потенциал системы и дает возможность регулировать активность модифицирующего фермента метаболитами, концентрации которых значительно варьируют. Например, в белых, «быстро сокращающихся» мышечных волокнах молярные концентрации сАМР-ПК, киназы фосфорилазы и фосфорилазы составляют 0,2; 2,5 и 80 мкМ соответственно [34], поэтому фосфорилаза не могла бы активироваться непосредственно сАМР, концентрация которого редко превышает 2—3 мкМ. Во-вторых, площадь поверхности одной белковой молекулы ограничена, и на ней невозможно разместить участки связывания всех регуляторов фермента, занимающего важное место в метаболизме.

В настоящее время ясно, что обратимое фосфорилирование ферментов лежит в основе сложной сети сопряженных каскадов, которая обеспечивает координированный и синхронизированный контроль многих биохимических функций в ответ на биологические сигналы (гормоны, нервные импульсы и т. д.).

Литература

1. Krebs E. G., Fischer E. H. *Biochim. et Biophys. Acta*, **20**, 150—157 (1956).
2. Krebs E. G., Graves D. J., Fischer E. H. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2867 (1959).
3. Friedman D. L., Larner J. *Biochemistry*, **2**, 669—675 (1963).
4. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. *J. Biol. Chem.*, **243**, 3763—3765 (1968).
5. Karnieli E., Zarnowski M. J., Hissin P. J., Simpson I. A., Salans L. B., Cushman S. W. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4772—4777 (1981).
6. Cori G. T., Colowick S. P., Cori C. F. *J. Biol. Chem.*, **123**, 381—389 (1938).
7. Cori G. T., Green A. A. *J. Biol. Chem.*, **151**, 31—38 (1945).
8. Titani K., Cohen P., Walsh K. A., Neurath H. *FEBS Lett.*, **55**, 120—123 (1975).
9. Cohen P. *Nature*, **296**, 613—620 (1982).

10. *Bagshaw C. R.* Muscle Contraction, Chapman and Hall, London, 1982.
11. *Danforth W. H., Helmreich E. J.* Biol. Chem., **239**, 3133—3138 (1964).
12. *Danforth W. H., Lyon J. B. J.* Biol. Chem., **239**, 4047—4050 (1964).
13. *Helmreich E., Cori C. F.* Adv. Enzyme Reg., **3**, 91—107 (1966).
14. *Cohen P.* Eur. J. Biochem., **111**, 563—574 (1980).
15. *Cohen P., Klee C. B., Picton C., Shenolikar S.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **356**, 151—161 (1980).
16. *Skuster J. E., Jesse-Chan K. F., Graves D. J.* Biol. Chem., **255**, 2203—2210 (1980).
17. *Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., Vaman T. C., Nairn A. C.* FEBS Lett., **92**, 287—293 (1978).
18. *Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 489—515 (1980).
19. *Kilhofer M. C., Gerard D., Demaille J. G.* FEBS Lett., **120**, 99—103 (1980).
20. *Picton C., Klee C. B., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **111**, 553—561 (1980).
21. *Helmreich E., Cori C. F.* J. Biol. Chem., **239**, 2440—2445 (1964).
22. *Lowry O. H., Schultz D. W., Passoneau J. V.* J. Biol. Chem., **239**, 1947—1953 (1964).
23. *Denton R. M., Pogson C.* Metabolic Regulation, Chapman and Hall, London, 1976.
24. *Gadian D. G., Radda G. K.* Ann. Rev. Biochem., **50**, 69—83 (1981).
25. *Schulman R. G.* Scientific American, **248**, 76—83 (1982).
26. *Danforth W. H., Helmreich E., Cori C. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **48**, 1191—1199 (1962).
27. *Karpatkin S., Helmreich E., Cori C. F.* J. Biol. Chem., **239**, 3139—3145 (1964).
28. *Gratecos D., Detwiler T., Fisher E. H.* In: Metabolic Interconversions of Enzymes (E. H. Fischer, E. G. Krebs, H. Neurath and E. R. Stadtman, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 43—52, 1974.
29. *Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.* Cyclic AMP, Academic Press, New York and London, 1971.
30. *Ross E. M., Gilman A. G.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 533—564 (1980).
31. *Kahn R. A., Katada T., Bokoch G. M., Northup J. K., Gilman A. G.* In: Post-translational Covalent Modifications of Proteins for Function (B. C. Johnson, ed.), Academic Press, New York and London, 1983 (in press).
32. *Pedersen S. E., Ross E. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **79**, 7228—7232 (1982).
33. *Krebs E. G., Beavo J. A.* Ann. Rev. Biochem., **48**, 923—959 (1979).
34. *Cohen P.* Curr. Top. Cell Reg., **14**, 117—196 (1978).
35. *Singh T. J., Akatsuka A., Huang K. P.* J. Biol. Chem., **257**, 13379—13384 (1982).

36. *Ingebritsen T. S., Cohen P.* Science (1983) in press.
37. *Aitken A., Bilham T., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **126**, 235—246 (1982).
38. *Foulkes J. G., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **97**, 251—256 (1979).
39. *Cohen P., Yellowlees D., Aitken A., Donella-Deana A., Hemmings B. A., Parker P. J.* Eur. J. Biochem., **124**, 21—35 (1982).
40. *Picton C., Aitken A., Bilham T., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **124**, 37—45 (1982).
41. *Parker P. J., Embi N., Caudwell F. B., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **124**, 47—55 (1982).
42. *Woodgett J. R., Tonks N. K., Cohen P.* FEBS Lett., **148**, 5—11 (1982).
43. *Roach P. J.* Curr. Top. Cell. Reg., **20**, 45—105 (1982).
44. *Roach P. J., DePaoli-Roach A. A., Larner J. J.* Cyt. Nuc. Res., **4**, 245—257 (1978).
45. *Parker P. J., Caudwell F. B., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **130**, 227—234 (1983).
46. *Villar-Palasi C., Larner J.* Biochem. et Biophys. Acta, **139**, 171—173 (1961).
47. *Danforth W. H. J.* Biol. Chem., **240**, 588—593 (1965).
48. *Picton C., Woodgett J. R., Hemmings B. A., Cohen P.* FEBS Lett., **150**, 191—196 (1982).
49. *Kuo J. F., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **64**, 1349—1355 (1969).
50. *Krebs E. G.* Curr. Top. Cell. Reg., **5**, 99—133 (1972).
51. *Fredrickson G., Stralfors P., Nilsson N. O., Belfrage P. J.* Biol. Chem., **256**, 6311—6320 (1981).
52. *Boyd G. S., Gorban A. N. S.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1. Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 95—134, 1980.
53. *Cook K. G., Yeaman S. J., Stralfors P., Fredrickson G., Belfrage P.* Eur. J. Biochem., **125**, 245—249 (1982).
54. *Hers H. G., Van Schaftingen E.* Biochem. J., **206**, 1—12 (1982).
55. *El-Maghrabi M. R., Claus T. H., Pilakis J., Fox E., Pilakis S. J.* J. Biol. Chem., **257**, 7603—7607 (1982).
56. *LaPorte D. C., Koshland D. E.* Nature, **300**, 458—460 (1982).
57. *Engstrom L.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 33—62, 1980.
58. *Hardie D. G.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 33—62, 1980.
59. *McGarry J. D., Foster D. W.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 395—420 (1980).
60. *Denton R. N., Hughes W. A.* Int. J. Biochem., **9**, 545—552 (1978).
61. *Randle P. J.* Phil-Trans. Roy. Soc. Lond. Series B (1983) (in press).
62. *England P. J.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 153—173, 1980.

63. *Haiech J., Demaille J. G.* Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Series B (1983) (in press).
64. *Cohen P.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 255—268, 1980.
65. *Nimmo H. G., Cohen P.* Adv. Cyc. Nuc. Res., **8**, 145—266 (1977).
66. *Cohen P., Aitken A., Damuni Z. et al.* In: Post-translational Covalent Modifications of Proteins for Function (B. C. Johnson), Academic Press, New York and London, 1983 (in press).
67. *Klug G. A., Botterman B. R., Stull J. T.* J. Biol. Chem., **257**, 4688—4690 (1982).
68. *Yamauchi T., Nakata H., Fujisawa H.* J. Biol. Chem., **256**, 5404—5409 (1981).
69. *Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Manalan A., Klee C. B., Cohen P.* FEBS Lett., **137**, 80—84 (1982).
70. *Adelstein R. S., Eisenberg E. A.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 921—956 (1980).
71. *Exton J. H. J.* Cyc. Nuc. Res., **5**, 277—287 (1979).
72. *Studer R. K., Borle A. B.* J. Biol. Chem., **257**, 7987—7993 (1982).
73. *Ingebritsen T. S., Gibson D. M.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (P. Cohen, ed.), vol. 1, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 63—93, 1980.
74. *Damuni Z., Cohen P.* Eur. J. Biochem., **129**, 57—65 (1982).
75. *Buhrow S. A., Cohen S., Staros J. V.* J. Biol. Chem., **257**, 4019—4022 (1982).
76. *Kasuga M., Zick Y., Blithe D. L., Crettaz M., Kahn C. R.* Nature, **298**, 667—669 (1982).
77. *Sefton B. M., Hunter T., Beemen K., Eckhart W.* Cell, **20**, 807—816 (1980).
78. *Denton R. M., Brownsey R. W., Belsham G. J.* Diabetologia, **21**, 347—362 (1981).
79. *Chock P. B., Rhee S. G., Stadtman E. R.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 813—843 (1980).

5. Регуляция ферментативной активности путем ковалентной модификации, отличной от ограниченного протеолиза и фосфорилирования

В соответствии с генетическим кодом при синтезе белков используются 20 разных аминокислот, однако *in vivo* обнаружено более 150 их производных, и поэтому ясно, сколь велика роль посттрансляционной модификации [1]. Наиболее часто встречаются производные, образующиеся в результате фосфорилирования и гликозилирования боковых цепей и ацетилирования α -аминогрупп. В настоящей главе рассмотрены ферменты, активность которых регулируется путем ковалентной модификации, не являющейся ограниченным протеолизом или фосфорилированием.

5.1. Регуляция активности глутаминсинтетазы *E. coli* путем аденилирования и уридилирования

5.1.1. Ингибирование по типу обратной связи

Центральное место в азотистом обмене у микроорганизмов занимает глутамин, так как обычно не свободный аммиак, а его амидная группа служит донором азота при синтезе триптофана, АМР, СТР, глюкозамин-6-фосфата, гистидина и карбамоилфосфата. Кроме того, α -аминогруппа глутамина используется в качестве источника азота для синтеза глицина и аланина, осуществляемого при действии специфических трансминаз. Естественно было ожидать, что именно глутаминсинтетаза как первый фермент сильно разветвленного пути, ведущего к синтезу широкого круга различных метаболитов, служит первичной мишенью для регуляторных воздействий. Однако механизм регуляции активности этого фермента, установленный Э. Стэдманом и его сотрудниками, оказался необычайно сложным.

E. coli имеет только одну глутаминсинтетазу; было показано, что *in vitro* фермент ингибируется всеми восемью конечными продуктами метаболизма глутаминна (рис. 5.1), при этом на него не оказывает влияния ни один из 50—60 исследованных метаболитов [2]. Каждый из конечных продуктов метаболизма глутаминна вызывает (даже в насыщающей концентрации) лишь частичное ингибирование, однако действие ингибиторов является аддитивным, поэтому в условиях избытка всех восьми конечных продуктов наблюдается почти полное ингибирование глутаминсинтетазы. Установление этого феномена, получившего название *кумулятивного ингибирования по типу обратной связи*, позволило сделать три вывода: каждый ингибитор

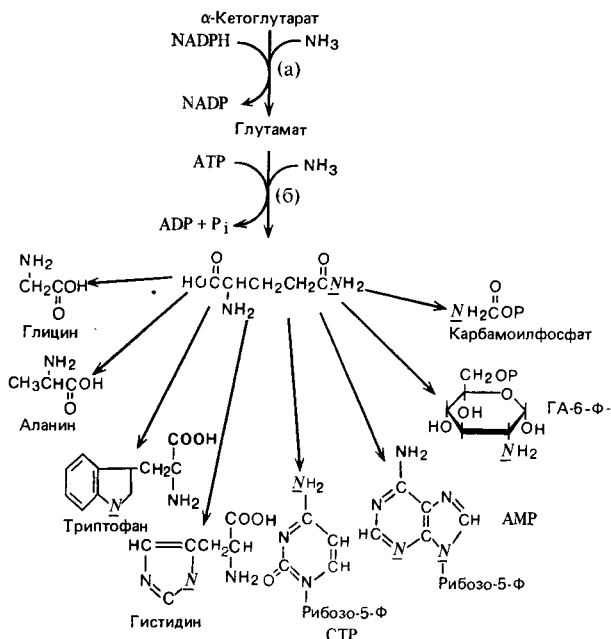


Рис. 5.1. Пути образования и превращения глутаминна. Атомы азота, поступающие от глутаминна, обозначены подчеркнутыми буквами [3]. а — глутаматдегидрогеназа, б — глутаминсинтетаза. ГА-6-Ф — глюкозамин-6-фосфат.

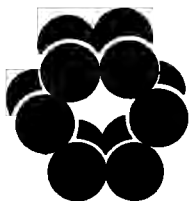


Рис. 5.2. Расположение субъединиц в глутаминсинтетазе *E. coli* [3, 5].

связывается с ферментом на определенном участке; все ингибиторы могут связываться одновременно; связывание одного ингибитора не влияет на связывание других ингибиторов. Эти представления подтвердились при прямом исследовании связывания АМР и триптофана [4]; было показано, что глутаминсинтетаза может присоединить 12 молекул каждого ингибитора-регулятора. Эти данные вполне соответствуют структуре фермента, который построен из 12 идентичных субъединиц ($M_r = 50\,000$), упакованных в виде двух гексагональных колец, расположенных одно над другим (рис. 5.2). Несмотря на относительно небольшой размер субъединицы, она имеет значительное число различных участков связывания.

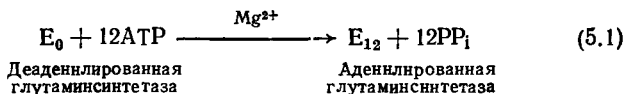
Для того чтобы кумулятивное ингибирование было эффективным, необходимо (по аналогии с ингибированием аспараткиназы) наличие дополнительного регуляторного механизма, действующего на первую реакцию каждой ветви метаболического пути; регулятором при этом должен выступать ее конечный продукт. Такие механизмы обнаружены во многих системах (гл. 2).

5.1.2. Аденилирование глутаминсинтетазы

В середине 60-х годов почти одновременно в двух лабораториях были получены данные, свидетельствующие о существовании еще одного механизма регуляции активности глутаминсинтетазы. В ФРГ Х. Хольцер [6] обнаружил, что при выращивании *E. coli* на среде, в которой источником азота служит не NH_4^+ , а другие соединения, в клетках наблюдается высокий уровень глю-

таминсинтетазной активности. Добавление в ростовую среду солей NH_4^+ вызывает быстрое (в течение минуты) десятикратное снижение активности фермента, которое нельзя объяснить подавлением его синтеза, поскольку период генерации клеток — 50 мин. Следовательно, NH_4^+ стимулировал инактивацию уже имевшихся молекул глутаминсинтетазы. Эффект специфичен для NH_4^+ , хотя в условиях *in vitro* NH_4^+ служит для фермента субстратом, а не ингибитором. Попытки объяснить данное явление привели к открытию фермента, катализирующего инактивацию глутаминсинтетазы *in vitro* в присутствии АТР, Mg^{2+} и глутамина. В связи с этим была выдвинута гипотеза, согласно которой NH_4^+ увеличивает внутриклеточную концентрацию глутамина за счет синтеза этого соединения из α -кетоглутарата и глутамата (рис. 5.1); образовавшийся глутамин активирует фермент, инактивирующий глутаминсинтетазу.

В это же время Э. Стэдтман в США обнаружил, что препараты глутаминсинтетазы, выделенные из клеток *E. coli*, выращенных в разных условиях, различаются по удельной активности, по специфичности к ионам двухвалентных металлов (Me^{2+}), а также по эффективности ответной реакции на ингибиторы, действующие по типу обратной связи [3, 4, 7]. Далее было установлено, что разные формы фермента содержат различные количества ковалентно связанной АМР. Стало ясно, что обе группы исследователей изучают один и тот же эффект и что инактивирующий белок Хольцера представляет собой аденилилтрансферазу (АТазу), катализирующую ковалентное присоединение АМР к определенной тирозильной группе в каждой из 12 субъединиц глутаминсинтетазы (рис. 5.3) [8—10]:



При превращении полностью деаденилированной глутаминсинтетазы (E_0) в полностью аденилированную (E_{12}) фермент переходит из активной Mg^{2+} -зави-

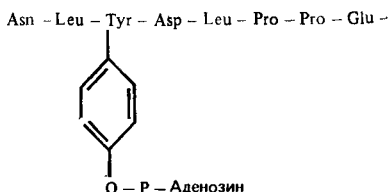


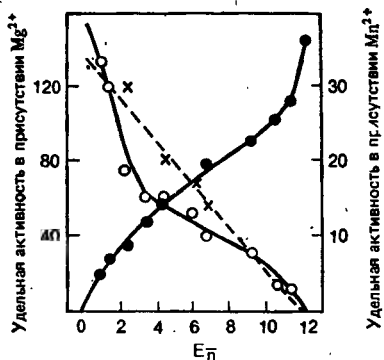
Рис. 5.3. Аминокислотная последовательность в участке аденилирования глутаминсинтетазы [11].

симой формы, имеющей оптимум pH 7,6, в менее активную Mn^{2+} -зависимую форму с оптимумом активности при pH 6,5 [4]. Mg^{2+} -зависимый E_0 -фермент ингибируется аланином, глицином и АМР, в то время как Mn^{2+} -зависимый E_{12} -фермент ингибируется преимущественно гистидином, триптофаном и СТР [7].

По-видимому, при функционировании глутаминсинтетазы, как и в случае других ферментов, катализирующих реакции с участием АТР, Mg^{2+} и Mn^{2+} образуют Mg^{2+} — АТР- и Mn^{2+} — АТР-комплексы; об этом свидетельствует тот факт, что для достижения оптимальной активности требуются равные концентрации Mg^{2+} и АТР. Известно, что *E. coli* хорошо растет на синтетических средах без добавления Mn^{2+} и внутриклеточные концентрации Mn^{2+} измеряются в мкМ, в то время как концентрации Mg^{2+} и АТР имеют порядок мМ; следовательно, физиологическое значение имеет только активность Mg^{2+} -зависимой формы. Таким образом, превращение E_0 в E_{12} следует рассматривать как трансформацию активной формы, чувствительной к ингибированию аланином, глицином и АМР, в неактивную форму фермента.

Однако это превращение происходит только в экстремальных условиях, например когда клетки, выращенные в условиях недостатка NH_4^+ , попадают в среду, богатую этим соединением. Обычно глутаминсинтетаза находится в промежуточных состояниях аденилирования. Это наводит на мысль о возможном существовании гибридных молекул, в которых аденилированными являются лишь некоторые из 12 субъединиц.

Рис. 5.4. Зависимость между степенью аденилирования и удельной активностью глутаминсинтетазы. (○—○) — Mg^{2+} -зависимая активность, (●—●) Mn^{2+} -зависимая активность; ×—× Mg^{2+} -зависимая активность, наблюдаемая при смешивании E_0 и E_{12} в различных соотношениях.



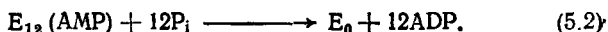
Число возможных форм глутаминсинтетазы (если учесть не только число аденилированных групп в молекуле фермента, но также их взаимное расположение в двух гексагональных кольцах) составляет 382! Приведенные на рис. 5.4 данные показывают, что гибридные молекулы с различными свойствами действительно существуют. Видно, что удельная активность глутаминсинтетазы не является линейной функцией степени аденилирования; наиболее резко выражены различия активности у форм, приближающихся по структуре к E_0 и E_{12} . Частично аденилированные формы отличаются также от эквивалентной смеси форм E_0 и E_{12} по другим кинетическим параметрам и по устойчивости к денатурации [12, 13].

Активность отдельной субъединицы в составе олигомера зависит от состояния соседних субъединиц (аденилированы они или не аденилированы), вероятно, из-за аллостерического влияния, которое передается через межсубъединичные контакты. Аналогичное предположение было высказано для АТКазы (гл. 2). Возможно, первоначально исследованные препараты глутаминсинтетазы представляли собой частично аденилированные формы фермента [2], поскольку для них было обнаружено кумулятивное ингибирование по типу обратной связи всеми восемью конечными продуктами и, кроме того, они оказались более чувствительными к этим ингибиторам, чем E_0 и E_{12} .

5.1.3. Регуляция аденилирования и деаденилирования путем обратимого уридилрования

При переносе *E. coli* из среды, богатой NH_4^+ , в бедную этим соединением среду происходит быстрая реактивация глутаминсинтетазы, что указывает на обратимость процесса аденилирования [6]. Данное наблюдение привлекло внимание к проблеме регуляции деаденилирования и послужило началом серии интересных исследований, результаты которых приведены ниже.

1. При деаденилировании происходит фосфорили- тическое расщепление связи тирозил-О-АМР [14]:



2. В реакции деаденилирования участвуют два белка, обозначенные P_I и P_{II} [15].

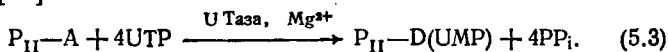
3. Белок P_I идентичен АТазе. Следовательно, один и тот же фермент катализирует оба процесса: аденилирование и деаденилирование [16].

4. АТаза ($M_r = 130\,000$) представляет собой бифункциональный полипептид с автономными каталитическими участками для реакций аденилирования и деаденилирования [17].

5. Белок P_{II} существует в двух формах, названных $P_{II}-A$ и $P_{II}-D$. В реакции аденилирования субстратами служат глутаминсинтетаза и АТР, а активаторами — $P_{II}-A$ и глутамин. $P_{II}-A$ активирует реакцию, увеличивая сродство глутаминсинтетазы (в 16 раз) к глутамину (в 10 раз) к АТазе. $P_{II}-A$ не влияет на $V_{\max}$ АТазы. Глутамин же увеличивает как $V_{\max}$ (в 20 раз), так и сродство к АТазе субстратов — глутаминсинтетазы (в 6 раз) и $P_{II}-A$ (в 10 раз) [3]. Для реакции деаденилирования абсолютно необходимы $P_{II}-D$, а также АТР и α -кетоглутарат [18].

6. Для превращения $P_{II}-A$ в $P_{II}-D$ необходимы УТР, специфичный фермент, а также АТР или α -кетоглутарат. В присутствии обоих активаторов — АТР и α -кетоглутарата — реакция образования $P_{II}-D$ ускоряется еще в 2—3 раза. Глутамин и P_I эту реакцию ингибируют [19, 20].

7. Белок P_{II} ($M_r = 44\,000$) состоит из четырех идентичных субъединиц. Превращение $P_{II}-A$ в $P_{II}-D$ происходит в результате катализируемого специфичной уридилитрансферазой (УТазой) ковалентного присоединения UMP (уридилирования) к одному или двум тирозильным остаткам каждой субъединицы [21]:



8. Деуридилирование катализируется уридилит-отщепляющим ферментом (UR-ферментом). Этот фермент может функционировать в присутствии либо Mn^{2+} , либо Mg^{2+} , но в последнем случае необходим еще α -кетоглутарат или АТР. В присутствии обоих активаторов — АТР и α -кетоглутарата — активность Mg^{2+} -зависимой формы UR-фермента увеличивается еще в 2 раза [22]:



УТазы и UR-фермент образованы одним полипептидом ($M_r = 98\,000$), который, подобно АТазе, проявляет бифункциональные свойства [23].

Суммируя приведенные данные, следует сделать заключение, что активность глутаминсинтетазы регулируется двумя каскадными системами, действие которых приводит к противоположным эффектам (рис. 5.5).

Инактивация глутаминсинтетазы (аденилирование) инициируется UR-ферментом, катализирующим превращение $P_{II}-D$ в $P_{II}-A$ (деуридилирование). В результате взаимодействия $P_{II}-A$ с АТазой последняя приобретает способность катализировать аденилирование глутаминсинтетазы. Сходным путем осуществляется и активация глутаминсинтетазы (деаденилирование); этот процесс инициируется УТазой и заключается в превращении $P_{II}-A$ в $P_{II}-D$ (уридилирование). В комплексе с $P_{II}-D$ АТазы катализует деаденилирование. Таким образом, в данной ситуации направление и скорость ферментативной реакции определяют аллостерические переходы, индуцируемые связыванием белка P_{II} .

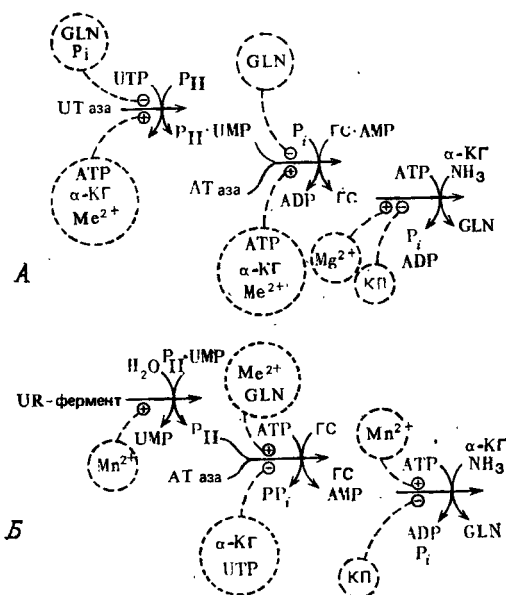


Рис. 5.5. Каскадная система регуляции активности глутаминсинтетазы (ГС). А. Активация (деадеилирование) ГС; Б. Инактивация (аденилирование) ГС; КП — конечные продукты; КГ — α-кетоглутарат [21, 22].

Стационарный уровень аденилирования находится под контролем ряда метаболитов: α-кетоглутарата, глутамина, UTP, ATP и P_i. Имеются также данные о том, что определенные фракции РНК могут влиять на активность Р_{II} [15], а промежуточные продукты гликолиза способны ингибировать АТазу [24]. Из этого следует, что список физиологических регуляторов еще далеко не исчерпан. Действие α-кетоглутарата, глутамина и UTP на две каскадные системы (рис. 5.5) приводит к противоположным эффектам; это обеспечивает высокую чувствительность уровня аденилирования даже к небольшим изменениям относительных концентраций указанных эффекторов. Одновременно обеспечивается и корреляция активности различных модифицирующих ферментов. Все это сводит к минимуму

возможность неконтролируемого сопряжения реакций (5.1) и (5.2), а также (5.3) и (5.4), которое могло бы привести к бесполезной потере большого количества энергии при гидролизе АТР и УТР. В экспериментах по реконструкции каскадных систем с использованием изолированных белковых компонентов и некоторых эффекторов было показано, что на регуляцию активности глутаминсинтетазы путем аденилирования и уридилирования расходуется менее 1% количества АТР, используемого глутаминсинтетазой непосредственно для синтеза глутамина (рис. 5.1). На регуляцию активности фермента путем обратимой ковалентной модификации безусловно тратится гораздо меньше энергии, чем ее потребовалось бы для синтеза новой молекулы фермента [25].

В то время как состояние аденилирования глутаминсинтетазы регулируется α -кетоглутаратом, глутамином, УТР, АТР и P_i , активность фермента находится под контролем восьми различных эффекторов, а именно конечных продуктов превращения глутамина (рис. 5.1). Отношение глутамин/ α -кетоглутарат можно рассматривать как чувствительный показатель концентрации NH_4^+ [26]. При избытке NH_4^+ будет происходить образование глутамина из α -кетоглутарата (рис. 5.1). В результате увеличения отношения глутамин/ α -кетоглутарат может произойти полное аденилирование глутаминсинтетазы. Однако при повышении концентрации NH_4^+ усиливается не только синтез глутамина; установлено, что при достаточно высокой концентрации NH_4^+ может служить донором азота (вместо амидной группы глутамина) в биосинтетических реакциях, приведенных на рис. 5.1. В условиях азотного голодания отношение глутамин/ α -кетоглутарат снижается, и может произойти полное деаденилирование (т. е. активация) глутаминсинтетазы. Это создает условия для эффективного использования даже небольших количеств доступного NH_4^+ . Обычно в клетках преобладают частично аденилированные формы глутаминсинтетазы; уровень модификации определяется относительным содержанием различных эффекторов.

Вероятно, *in vivo* функционирует полный набор гибридных молекул, обладающих различной степенью чувствительности к восьми ингибиторам, действующим по типу обратной связи.

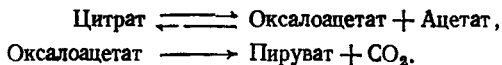
Влияние УТР (стимуляция деаденилирования и увеличение глутаминсинтетазной активности) противоположно действию ингибитора (по типу обратной связи) СТР. Это еще раз свидетельствует о необходимости сбалансированного синтеза различных нуклеозидтрифосфатов (гл. 2).

Таким образом, инициируемая глутамином инактивация глутаминсинтетазы осуществляется в результате ковалентной модификации — аденилирования. Потенциальные преимущества ковалентной модификации по сравнению с «прямым» аллостерическим влиянием обсуждались в гл. 4. Удивительно, что этот эффективный тип регуляции сформировался только у грамотрицательных бактерий и встречается лишь у одной грамположительной бактерии — *Streptomyces cattleya* [27]. У *Bacillus subtilis* глутаминсинтетаза ингибируется непосредственно глутамином; по-видимому, ее активность не регулируется путем ковалентной модификации [28]. Изучение регуляции глутаминсинтетазы у *E. coli* показывает, что у прокариот функционируют системы, сравнимые по степени сложности с теми, которые обнаружены у эукариотических клеток. Например, до настоящего времени у эукариот не обнаружено регуляции активности ферментов путем аденилирования или уридилирования.

5.2. Регуляция активности цитратлиазы в анаэробных бактериях путем ацетилирования—деацетилирования [29]

Цитрат — широко распространенное в природе соединение; он найден во многих растениях, в молоке и в костях. Поэтому неудивительно, что многие виды бактерий способны использовать его для роста. Поскольку анаэробные бактерии обычно не обладают полным набором ферментов цикла трикарбоновых кислот, превращение цитрата в этих бактериях осу-

ществляется с помощью цитратлиазы и оксалоацетат-декарбоксилазы. Эти ферменты катализируют следующие реакции:



В состав цитратлиазы входят производные кофермента А, ацетилированные по SH-группе. Ацетильные остатки непосредственно участвуют в ферментативной реакции. Сначала происходит активация цитрата в результате трансферазной реакции:



Затем цитрат расщепляется и таким образом восстанавливается ацетилированная форма фермента:



Цитратлиаза состоит из субъединиц трех типов: $M_r = 54\,000$, $32\,000$ и $10\,000$; молекула фермента содержит шесть субъединиц каждого типа. Большая субъединица ($M_r = 54\,000$) катализирует трансферазную реакцию, субъединица с $M_r = 32\,000$ — реакцию расщепления, а самая маленькая субъединица содержит ацетильную группу.

У тех микроорганизмов, у которых единственным ферментом, атакующим цитрат, является цитратлиаза, нет необходимости в регуляции ее активности. Например, у *Streptococcus diacetilactis*, для роста которого необходим L-глутамат, отсутствуют ферменты, образующие глутамат из цитрата, и активность цитратлиазы не регулируется. Однако многие анаэробы способны синтезировать глутамат (из цитрата) и содержат также цитратсинтазу, действие которой противоположно действию цитратлиазы. Понятно, что в этой ситуации активность цитратлиазы должна строго контролироваться, в противном случае при ограниченном количестве цитрата в среде действие этого фермента будет препятствовать синтезу глутамата и глутамина. Примером может служить *Rhodopseudomonas gelatinosa*; этот микроорганизм быстро расщепляет цитрат в анаэробных условиях на свету. Было установлено, что при

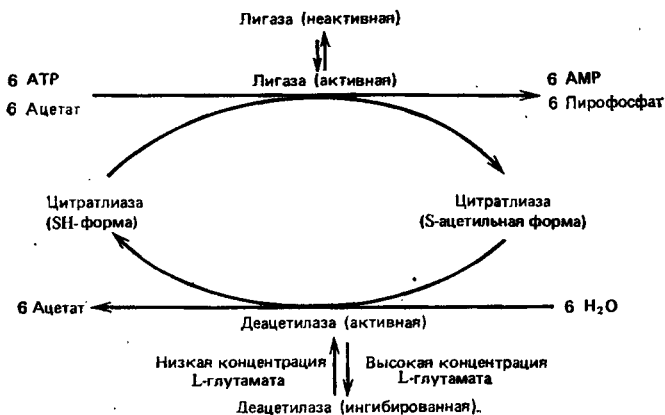


Рис. 5.6. Система регуляции цитратлиазы у *Rhodospseudomonas gelatinosa* [29].

наличии в среде цитрата неактивная SH-форма цитратлиазы быстро переходит в активную S-ацетильную форму; последняя деацетируется тогда, когда цитрат оказывается израсходованным (рис. 5.6).

Ацетилирование осуществляется ферментом, получившим название «лигаза цитратлиазы», а деацетилирование — «деацетилазой цитратлиазы». В отсутствие цитрата лигаза ($M_r \sim 41\,000$) находится в неактивной форме, но при добавлении цитрата в культуральную среду быстро превращается в активную форму. Молекулярный механизм активации неизвестен. Деацетилаза сильно ингибируется L-глутаматом (рис. 5.6); тем самым обеспечивается сохранение активности цитратлиазы в условиях, когда концентрация глутамата достаточна для синтеза глутамина.

В клетках млекопитающих не обнаружено ни одного фермента, регулируемого путем обратимого ацетилирования. Установлено, однако, что в ядре происходит обратимое ацетилирование гистонов по ϵ -аминогруппам лизина [30]. Этот процесс играет существенную роль в регуляции транскрипции.

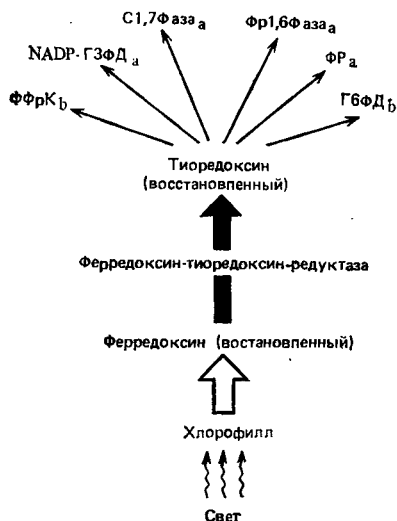


Рис. 5.8. Роль тиоредоксина в регуляции ферментов хлоропластов [32]; а — активированная форма, б — инактивированная форма. Сокращения названий ферментов приведены в тексте.

(C1,7Фаз), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (Фр 1,6Фаз) и фосфорибулокиназа (ФРК)] быстро активируются (рис. 5.8). В то же время известно, что фосфофруктокиназа (ФФРК), гликолитического пути и NADP-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФД) окислительного пентозофосфатного пути на свету инактивируются.

На рис. 5.8 схематически изображен механизм регуляции светом активности этих ферментов. Он заключается в следующем: на свету происходит перенос электронов от хлорофилла на атом железа, находящийся в активном центре белка ферредоксина. Окисление атома железа восстановленного ферредоксина сопряжено с восстановлением другого белка, называемого тиоредоксином; этот процесс катализирует фермент ферредоксин-тиоредоксин-редуктаза (рис. 5.8). Тиоредоксин ($M_r \sim 12\,000$) содержит участвующий в окислительно-восстановительных реакциях дисульфидный мостик; в восстановленной (SH)-форме он функционирует как редуктаза дисульфидных групп белков. Отсюда следует, что активация ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла должна осу-

ществляться путем превращения неактивных —S—S-форм ферментов в активные SH-формы. Это представление подтверждается данными о том, что тиолы, например дитиотреитол (ДТТ), действуют подобно тиоредоксину. В то же время инактивация фосфофруктокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы может происходить в результате их перехода из активной —S—S-формы в неактивную SH-форму, поскольку ДТТ действует на эти ферменты подобно свету.

Ферменты, восстановленные тиоредоксином на свету в SH-форму, вновь окисляются в темноте и переходят в —S—S-форму. Этот процесс катализируют, например, такие соединения, как окисленный глутатион, однако его механизм окончательно не установлен.

Регуляция активности ферментов у растений путем тиол-дисульфидного обмена, как и фосфорилирование—дефосфорилирование у млекопитающих, дополняется действием различных аллостерических эффекторов. Например, рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилаза, которая катализирует превращение рибулозо-1,5-бисфосфата в 3-фосfogлицерат (рис. 5.7), аллостерически активируется NADPH и ATP [31]. Вот почему в условиях, когда имеется достаточное количество восстановительных эквивалентов и энергии (ATP), фиксация CO₂ ускоряется. Продукт реакции — 3-фосfogлицерат — действует как активатор (по типу опережающей связи) фермента ADP-глюкозопирофосфорилазы, катализирующей стадию, лимитирующую скорость пути биосинтеза крахмала [32, 33].

На свету происходит приток в хлоропласты ионов кальция, которые активируют NAD-киназу — фермент, превращающий NAD в NADP; следовательно, возрастает концентрация NADPH, участвующего в реакциях восстановительного пентозофосфатного цикла. Активация NAD-киназы ионами Ca²⁺ опосредована кальмодулином подобно тому, как это описано в гл. 4 для фосфодиэстеразы cAMP и аденилатциклазы [34]. В хлоропластах имеются значительные количества кальмодулина; по структуре и Ca²⁺-связывающим свойствам кальмодулины хлоропластов и тканей млекопитающих очень сходны [35, 36].

Тиоредоксин и сходный с ним белок, называемый глутаредоксином, обнаружены в высоких концентрациях во всех исследованных прокариотических и эукариотических клетках [37]. Весьма вероятно поэтому, что регуляция активности ферментов путем тиол-дисульфидного обмена осуществляется не только в высших растениях. Восстановленные тиоредоксин и глутаредоксин могут также выступать в качестве доноров водорода при функционировании ряда ферментов, например рибонуклеотидредуктазы, катализирующей образование дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК [38]. Они могут осуществлять также восстановление случайно образующихся дисульфидных мостиков в белках.

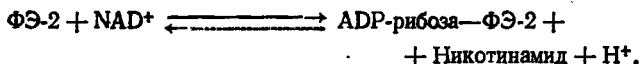
5.4. NAD^+ -зависимые реакции ADP-рибозилирования

5.4.1. Механизм действия дифтерийного токсина [39, 40]

Дифтерия представляет собой инфекционное заболевание, вызываемое у человека и некоторых млекопитающих патогенным микроорганизмом *Corynebacterium diphtheriae*. И хотя сам возбудитель остается на месте внедрения — в верхних дыхательных путях, многие внутренние органы оказываются пораженными. Это обусловлено тем, что *C. diphtheriae* секретирует специфический белковый токсин, который циркулирует в организме и вызывает патологические изменения. Для лабораторных морских свинок летальная доза токсина составляет всего 0,1 мкг на 1 кг веса тела; гибель животных наступает через 4—5 дней.

Показано, что механизм действия токсина заключается в подавлении белкового синтеза; в культуре клеток оно наступает через 1—2 ч [41]. В бесклеточных системах подавление имеет место только в том случае, если в систему наряду с токсином вводили NAD . Оказалось, что происходит модификация одного из компонентов системы синтеза белка, а именно фактора элонгации 2 (ФЭ-2), который необходим для GTP-зависимой транслокации пептидил-тРНК с акцепторно-

го на донорный участок рибосомы, а также для перемещения мРНК на один нуклеотидный триплет после каждого цикла образования пептидной связи. Установлено, что дифтерийный токсин — это фермент, катализирующий ADP-рибозилирование ФЭ-2; таким образом, было найдено простое объяснение его высокой токсичности:



ADP-рибозильная группа присоединяется к одному из атомов азота в кольце дифтамида (производное гистидина, рис. 5.9). Это соединение не было обнаружено ни в одном белке, кроме ФЭ-2 [42]. ADP-рибозилирование ФЭ-2 не влияет на его способность взаимодействовать с GTP или связываться с рибосомами, однако GTP-азная активность при ADP-рибозилировании исчезает. В результате GTP не гидролизруется до GDP и пептидил-тРНК не транслоцируется от акцепторного участка рибосомы на донорный.

Дифтерийный токсин синтезируется в форме, не обладающей ферментативной активностью. Для появления активности необходимо, чтобы молекула токсина была расщеплена в определенных участках протеиназой, а дисульфидные мостики восстановлены. На рис. 5.10 показан механизм активации, осуществляемой трипсином. Трипсин «надрезает» молекулу токсина по связям, образованным тремя сближенными в

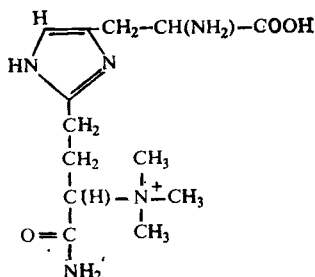


Рис. 5.9. Предполагаемая структура дифтамида (2-[3-карбоксамидо-3-(триметиламино)пропил] гистидина) [42].

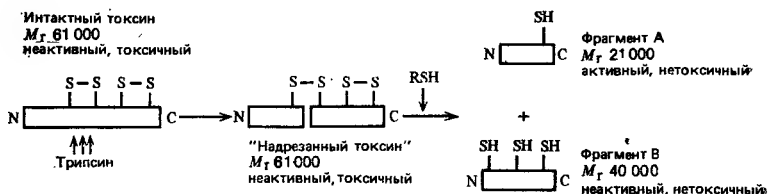


Рис. 5.10. Механизм активации дифтерийного токсина трипсином.

структуре остатками аргинина (189, 191 и 192 с N-конца). В результате восстановления ряда дисульфидных мостиков образуется ферментативно активный N-концевой А-фрагмент и неактивный С-концевой В-фрагмент. Однако в отличие от интактного и «надрезанного» токсина ни фрагмент А, ни фрагмент В не оказывают токсического действия на культуру клеток.

Были выделены мутантные белки, не обладающие токсичностью из-за изменений либо в А-, либо в В-части молекулы. Смесь нетоксичного мутантного белка, измененного в А-части молекулы, и нетоксичного мутантного белка, измененного в В-части, приобретала токсичность лишь в том случае, если ее сначала инкубировали с трипсином, затем с тиолом, а потом удаляли тиол диализом (в условиях, обеспечивающих окисление SH-групп с образованием дисульфидных мостиков). Эти эксперименты по «гибридизации» отчетливо показали, что для токсичности молекулы необходимы как В-часть, так и А-часть, обладающая ADP-рибозилирующей активностью. В опытах на культуре клеток нетоксичные белковые мутанты с неактивным А-фрагментом вели себя как конкурентные ингибиторы нативного токсина. Отсюда следует, что токсин связывается со специфическими рецепторными участками на поверхности клетки. Впоследствии было установлено, что связывание интактного или «надрезанного» токсина с клетками осуществляется в результате взаимодействия его молекул с молекулами гликопротеина, расположенными на поверхности клетки [43]. Следует отметить, что сначала в клетку проникает А-субъединица; механизм это-

го процесса остается еще невыясненным. In vivo «надрезание» токсина может осуществляться протеиназами, присутствующими в крови (гл. 3) или внутри клетки. Внутриклеточное восстановление дисульфидных связей происходит, по-видимому, при участии глутатиона или тиоредоксина; образующийся А-фрагмент катализирует инактивацию ФЭ-2. Синтез белка в различных внутренних органах оказывается подавленным, и это обуславливает их патологические изменения. Таким образом, события сводятся к ковалентной модификации двух типов — ограниченному протеолизу и ADP-рибозилированию.

Токсин, вырабатываемый бактериями другого вида (*P. aeruginosa*), катализирует такую же реакцию, как дифтерийный токсин [44]. Наблюдаемые при его действии симптомы (гипотензивный шок у собак и обезьян) отличаются от тех, которые характерны для дифтерии, что обусловлено различиями в клеточной специфичности данных токсинов. Важной характеристикой токсина *P. aeruginosa* является его стабильность in vivo.

5.4.2. Механизмы действия холерного токсина, токсина коклюша и токсина сибирской язвы

Холерный токсин — это белок, секретируемый бактерией *vibrio cholerae*. Его действие заключается в необратимой активации аденилатциклазы во всех клетках млекопитающих, в частности, значительно увеличивается уровень сАМР в клетках слизистой кишечника. Поскольку сАМР играет важную роль в регуляции всасывания воды в кишечном тракте, развивается чрезвычайно сильная диаррея и наступает обезвоживание организма.

Молекула холерного токсина состоит из одной А-субъединицы ($M_r=27\,000$) и пяти В-субъединиц ($M_r=11\,600$); А-субъединица быстро расщепляется протеиназами на два фрагмента — А1 ($M_r=22\,000$) и А2 ($M_r=5\,000$), которые остаются соединенными дисульфидным мостиком. Связывание токсина с плазматическими мембранами осуществляется через В-субъ-

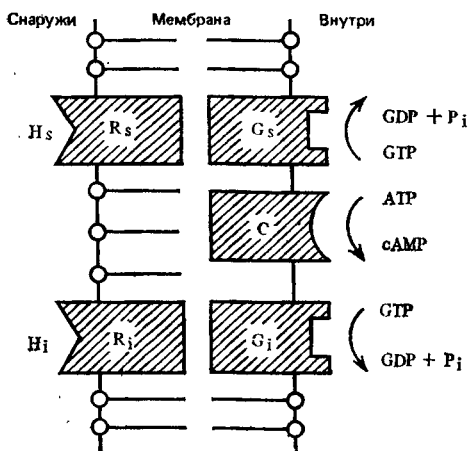


Рис. 5.11. Пятикомпонентная модель аденилатциклазы; показаны пути активации и ингибирования активности. R_s — рецептор стимулирующего гормона; R_i — рецептор ингибирующего гормона; G_s , G_i — регуляторные белки, опосредующие действие соответственно стимулирующего и ингибирующего гормонов; C — каталитическая субъединица аденилатциклазы; H_s , H_i — стимулирующий и ингибирующий гормоны.

единицу, которая взаимодействует с ганглиозидом GM1; именно она, по-видимому, инициирует проникновение токсина в клетку. За активацию аденилатциклазы ответствен Al-фрагмент. Он катализирует ADP-рибозилирование белка G_s (гл. 4; рис. 5.11). Наступающее при этом ингибирование GTPазной активности обуславливает постоянно активированное состояние аденилатциклазы [43, 45].

Связывание некоторых гормонов с их рецепторами вызывает не активацию аденилатциклазы, а ее ингибирование; оно наступает, например, при взаимодействии адреналина с α -рецептором или энкефалинов с опиатным рецептором. В этом процессе участвует, по-видимому, еще один гуаниннуклеотид-связывающий белок, называемый G_i -белком (рис. 5.11). G_i -белок, подобно G_s -белку, представляет собой GTPазу [46]. Предполагают, что гормоны, ингибирующие аденилат-

циклазу, стимулируют GTPазную активность G_i -белка, вызывая образование неактивного комплекса G_i —GDP. Напомним, что в случае действия стимулирующих гормонов (гл. 4) активирование аденилатциклазы происходит в результате регенерации G_s —GTP из G_s —GDP; влияния на GTPазную активность гормоны не оказывают. Установлено, что один из токсинов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Bordetella pertussis*, вызывающей заболевание коклюшем, катализирует ADP-рибозилирование G_i -белка и, предотвращает ингибирование аденилатциклазы при связывании адреналина с α_2 -рецептором. Вероятно, последнее достигается в результате ингибирования GTPазной активности (рис. 5.11). Этот токсин получил название IAP (Islet activating protein). Он не дает адреналину ингибировать освобождение инсулина, которое осуществляется β -клетками поджелудочной железы [47].

G_s -белок ($M_r=80\,000$) состоит из двух субъединиц, имеющих $M_r=45\,000$ и $35\,000$; G_i -белок ($M_r=80\,000$) также образован двумя субъединицами ($M_r=41\,000$ и $35\,000$). Холерный токсин катализирует ADP-рибозилирование субъединицы белка G_s с $M_r=45\,000$, а IAP — ADP-рибозилирование субъединицы белка G_i с $M_r=41\,000$. Компоненты G_s и G_i , обладающие $M_r=35\,000$, очень сходны между собой, а возможно даже идентичны [48].

Интересно отметить, что *Bordetella pertussis* секретирует еще один белок, растворимую аденилатциклазу, которая практически неактивна в отсутствие кальмодулина [49]. Весьма вероятно, что этот белок также может проникать в клетки млекопитающих и активироваться находящимся в них кальмодулином. Таким образом, увеличение уровня cAMP в клетках организма, инфицированного *Bordetella pertussis*, может быть обусловлено двумя независимыми причинами.

Токсин, вызывающий симптомы сибирской язвы, включает три белка: защитный антиген (ЗА), летальный фактор (ЛФ) и фактор отека (ФО); каждый из них в отдельности не вызывает физиологических эффектов, но попарно факторы проявляют токсичность.

Введение крысам ЗА вместе с ЛФ вызывает гибель животных в течение 60 мин, а совместное введение ЗА и ФО приводит к развитию отека кожи (набухание вследствие накопления воды) у кроликов и морских свинок. Установлено, что ФО — это аденилатциклаза, которая, подобно токсину *Bordetella pertussis*, неактивна в отсутствие кальмодулина. Имеющиеся данные показывают, что ЗА при взаимодействии с клетками образует рецепторную систему, обеспечивающую переход ФО и ЛФ в цитоплазму [50].

5.4.3. Инактивация РНК-полимеразы *E. coli* при инфицировании бактериофагом Т4

Известно, что *Corynebacterium diphtheriae* становится патогенной только после того, как она сама окажется инфицированной определенным бактериофагом. В настоящее время установлено, что структурный ген дифтерийного токсина (и, возможно, других токсинов) входит в состав фагового генома [39]. Неудивительно поэтому, что бактериофаги используют ADP-рибозилирование для подавления некоторых жизненно важных функций бактерий-хозяев.

Спустя несколько минут после проникновения бактериофага в клетку *E. coli* генетический аппарат бактерии переключается с транскрипции собственного генома на транскрипцию фага Т4; при этом используется РНК-полимераза *E. coli*. В этом процессе участвуют две разные реакции ADP-рибозилирования, получившие названия реакции *альтерации* и реакции *модификации* [51].

Реакция *альтерации* катализируется ADP-рибозилтрансферазой, находящейся в головке фага Т4; этот фермент проникает в бактерию вместе с фаговой ДНК. ADP-рибозилированию подвергаются специфические аргининовые остатки молекулы полимеразы (имеющей структуру $\beta\beta'\alpha_2\sigma$) в α - и σ -субъединицах и в меньшей степени в β - и β' -субъединицах. Стабильность образующихся соединений предполагает, что между ADP-рибозильной группой и гуанидиновой группой аргинина образуется N-гликозидная связь. Реакция *альтера-*

ции завершается в течение первой минуты от начала заражения; при этом ADP-рибозилированию подвергается не более 50% α -субъединиц. Следует отметить также, что ADP-рибозилирование β -, β' - и σ -субъединиц обратимо (через несколько минут после заражения эти субъединицы оказываются интактными). Значение реакции альтерации остается неясным, так как мутанты фага, лишенные ADP-рибозилтрансферазы, сохраняют способность репродуцироваться в клетках [51]. Реакция модификации влияет на синтез белка в зараженной клетке; она осуществляется через несколько минут после реакции альтерации. В результате реакции модификации происходит количественное ADP-рибозилирование определенного остатка аргинина в α -субъединице [52]; вероятно, именно поэтому полимеразы перестают транскрибировать геном *E. coli*, но сохраняют при этом способность к транскрипции генов фага T4. Можно полагать, что α -субъединицам принадлежит важная роль во взаимодействии полимеразы с промоторными участками генома *E. coli* [53]. Реакции альтерации и модификации катализируются различными ферментами, так как мутации, затрагивающие эти функции, локализуются в различных участках генома фага [54].

5.5. Заключение

Хотя число различных типов посттрансляционной модификации аминокислот в составе белков *in vivo* превышает 150 [1], по-видимому, лишь немногие из них используются для регуляции активности ферментов. Известно, что активность многих ферментов в фотосинтезирующих организмах может регулироваться с помощью тиол-дисульфидного превращения. Присутствие тиоредоксина в клетках млекопитающих [37] свидетельствует о том, что этот тип регуляции действительно имеет широкое распространение. Регуляция небольшого числа бактериальных ферментов, по-видимому, осуществляется путем обратимого аденилирования, уридилирования и ацетилирования.

ADP-рибозилирование обнаружено только в клетках, зараженных бактериальными вирусами или подвергшихся действию токсинов; вместе с тем хорошо известно, что происходит ADP-рибозилирование и белков, не являющихся ферментами; например, в ядрах клеток млекопитающих модифицируются гистоны [55].

Действие токсинов и вирусов весьма сходно с действием нервных сигналов и гормональных факторов; в обоих случаях внутриклеточные функции изменяются под влиянием внешних агентов. Бактериальные токсины и гормоны очень эффективны; их действие во всех случаях начинается со связывания с рецепторами, локализованными на плазматических мембранах клеток-мишеней. Оно часто опосредовано ковалентной модификацией внутриклеточных белков; в некоторых случаях гормоны и токсины активируют один и тот же фермент (аденилатциклазу). Многие токсины являются ферментами, и поэтому одна молекула токсина в принципе способна катализировать модификацию всех доступных молекул субстрата, имеющих в клетке. Это обуславливает их исключительно высокую токсичность.

Литература

1. Wold F. *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 783—814 (1981).
2. Woolfolk C. A., Stadtman E. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 313—319 (1964); *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 736—755 (1967).
3. Stadtman E. R., Shapiro B. M., Kingdon H. S., Woolfolk C. A., Hubbard J. S. *Adv. Enz. Reg.*, 6, 257—289 (1968).
4. Shapiro B. M., Stadtman E. R. *Ann. Rev. Microbiol.*, 24, 501—524 (1970).
5. Valentine R. C., Shapiro B. M., Stadtman E. R. *Biochemistry*, 7, 2143—2152 (1968).
6. Holzer H., Mecke D., Wulff K., Liess K., Heilmeyer L. *Adv. Enz. Reg.*, 5, 211—225 (1967).
7. Kingdon H. S., Stadtman E. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 470—473 (1967).
8. Shapiro B. M., Kingdon H. S., Stadtman E. R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58, 642—649 (1967).
9. Kingdon H. S., Shapiro B. M., Stadtman E. R. In: *Metabolic Interconversions of Enzymes 1966*, Springer-Verlag, Heidelberg, vol. 58, pp. 1703—1710, 1967.

10. Wulff K., Mecke D., Holzer H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 740—745 (1967).
11. Heinrich R., Kingdon H. S. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1099—1106 (1971).
12. Stadtman E. R., Ginsburg A., Ciardi J. E., Heh J., Hennig S. B., Shapiro B. M., *Adv. Enz. Reg.*, **8**, 99—118 (1970).
13. Ciardi J. E., Cimino F., Stadtman E. R. *Biochemistry*, **12**, 4321—4330 (1973).
14. Anderson W. B., Stadtman E. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 704—709 (1970).
15. Shapiro B. M., *Biochemistry*, **8**, 659—670 (1969).
16. Anderson W. B., Hennig S. B., Ginsburg A., Stadtman E. R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67**, 1417—1424 (1970).
17. Rhee S. G., Chock P. B., Stadtman E. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **75**, 3138—3142 (1978).
18. Stadtman E. R., Brown M., Segal A., Anderson W. A., Hennig S. B., Ginsburg A., Mangum J. H. In: *Metabolic Interconversions of enzymes 1971* (E. Helmreich, H. Holzer and O. Wieland, eds.), Sprigner-Verlag, Heidelberg, pp. 231—244, 1972.
19. Brown M. S., Segal A., Stadtman E. R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 2949—2953 (1971).
20. Mangum J. H., Magni G., Stadtman E. R. *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 514—525 (1973).
21. Adler S. P., Purich D., Stadtman E. R. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6264—6272 (1975).
22. Adler S. P., Mangum J. H., Magni G., Stadtman E. R. In: *Metabolic Interconversions of Enzymes 1973* (E. H. Fischer, E. G. Krebs, H. Neurath and E. R. Stadtman, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 221—233, 1974.
23. Garcia E., Rhee S. G. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2246—2253 (1983).
24. Ebner E., Wolf D., Gancedo C., Holzer H. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 535—544 (1970).
25. Segal A., Brown M. S., Stadtman E. R. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 319—327, (1974).
26. Schutt H., Holzer H. *Eur. J. Biochem.*, **26**, 68—72 (1972).
27. Streicher S., Tyler B. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **78**, 229—233 (1981).
28. Hubbard J. S., Stadtman E. R. *J. Bacteriol.*, **94**, 1007—1015 (1967).
29. Gottschalk G., Giffhorn F., Antranikian G. *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 324—326 (1982).
30. Johnson E. M., Allfrey V. G. In: *Biochemical Actions of Hormones*, **5** (G. Litwack, ed.), Academic Press, New York, pp. 1—51, 1978.
31. Buchanan B. B. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **31**, 341—374 (1980).
32. Preiss J. *Advances in Enzymology*, **46**, 317—381 (1978).
33. Copeland L., Preiss J. *Plant Physiol.*, **68**, 996—1001 (1981).
34. Anderson J. M., Cormier M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 595—602 (1978).

35. *Anderson J. M., Charbonneau H., Jones H. P., McCann R. O., Cormier M. J.* Biochemistry, **19**, 3113—3120 (1980).
36. *Jarrett H. W., Brown C. J., Black C. C., Cormier M. J.* J. Biol. Chem., **257**, 13795—13804 (1982).
37. *Holmgren A.* Trends in Biochemical Sciences, **6**, 26—29 (1981).
38. *Thelander L., Reichard P.* Ann. Rev. Biochem., **48**, 133—158 (1979).
39. *Collier R. J.* Bacteriol. Rev. **39**, 54—85 (1975).
40. *Uchida J.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation, 2 (S. Van Heyningen and P. Cohen, eds.), Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 1—31, 1982.
41. *Strauss N., Hendee E. D. J.* Exp. Med., **109**, 145—163 (1959).
42. *Van Ness B. G., Howard J. B., Bodley J. W. J.* J. Biol. Chem., **255**, 10710—10716 (1980).
43. *Van Heyningen S.* In: Molecular Aspects of Cellular Regulation, 2 (S. Van Heyningen and P. Cohen, eds.), Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 169—190, 1982.
44. *Iglewski B. H., Kabat D.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **72**, 2284—2288 (1975).
45. *Ross E. M., Gilman A. G.* Ann. Rev. Biochem., **49**, 533—564 (1980).
46. *Koski G., Streaty R. A., Klee W. A.* J. Biol. Chem., **257**, 14035—14040 (1982).
47. *Katadr T., Ui M. J.* J. Biol. Chem., **257**, 7210—7216 (1982).
48. *Kahn R. A., Katadr T., Bokoch G. M., Northup J. K., Gilman A. G.* In: Post-translational Covalent Modifications of proteins for function (B. C. Johnson, ed.), Academic Press, New York, 1983 (in press).
49. *Greenlee D. V., Andreasen T. J., Storm D. R.* Biochemistry, **21**, 2759—2764 (1982).
50. *Leppla S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **79**, 3162—3166 (1982).
51. *Rohrer H., Zillig W., Mailhammer R.* Eur. J. Biochem., **60**, 227—238 (1975).
52. *Goff C. G.* In: Metabolic Interconversions of Enzymes 1973 (E. H. Fischer, E. G. Krebs, H. Neurath and E. R. Stadtman, eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 235—244, 1974.
53. *Mailhammer R., Reiness G., Ponta H., Yang H. L., Schweiger M., Zillig W., Zubay G.* In: Metabolic Interconversions of Enzymes 1975 (S. Shaltiel, ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 161—167, 1976.
54. *Rabussey D.* In: Mol. Asp. Cell. Reg., 2 (S. Van Heyningen and P. Cohen, eds.), Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 219—231, 1982.
55. *Okayama H., Veda K., Hayaishi O.* Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **75**, 1111—1115, (1978).

6. Природа аллостерических эффектов

Какова природа изменений активности фермента, вызываемых связыванием аллостерического эффектора или ковалентной модификацией (например, фосфорилированием)? Почему графики зависимости активности фермента от концентрации субстрата или эффектора часто имеют *сигмоидный* характер? Для ответа на эти вопросы необходимо сначала определить трехмерную структуру фермента при высокой степени разрешения, а затем установить, какие именно изменения конформации фермента происходят при связывании субстратов и эффекторов или при ковалентной модификации. Только для двух ферментов, рассмотренных в гл. 2, 4 и 5 — АТКазы [1] и фосфорилазы [2—4], — получены рентгеноструктурные данные с разрешением 0,3 нм. И даже для этих ферментов представления о природе конформационных изменений при действии аллостерических эффекторов имеют предварительный характер. Имеются данные о том, что при переходе АТСаза из активного в неактивное состояние происходит небольшое увеличение объема молекулы фермента; сохранение структуры $C:R-R:C$ (рис. 2.12) позволяет предполагать, что при этом изменяется положение тримеров, образованных каталитическими субъединицами, относительно димеров регуляторных субъединиц.

Молекула фосфорилазы *b* состоит из двух идентичных субъединиц ($M_r=97\ 000$), симметрично расположенных относительно кристаллографической оси второго порядка. Участок связывания аллостерического активатора АМР (рис. 6.1) находится в области контакта субъединиц, а нуклеотид взаимодействует с аминокислотными остатками обеих субъединиц. В частности, адениновое основание встраивается между боко-

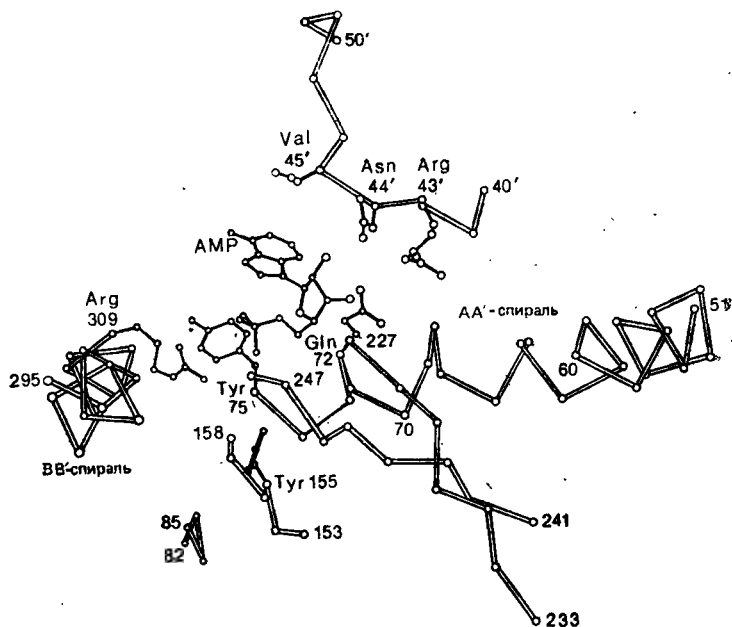


Рис. 6.1. АМР-связывающий участок гликогенфосфориллазы *b* (личное сообщение д-ра Луизы Джонсон).

выми группами Туг-75 (из спирали АА') и Val-45 соседней субъединицы. Гидроксил второго атома рибозы образует водородную связь с карбонилom Asn-44 основной цепи соединений субъединицы. Фосфатная группа АМР стабилизируется при взаимодействии с гуанидильной группой Arg-309 из спирали ВВ'. Участок связывания аллостерического эффектора удален примерно на 3,2 нм от каталитического центра, и в настоящее время не очень понятно, как взаимодействуют между собой эти участки молекулы. Можно полагать, что перемещение спирали ВВ', обусловленное взаимодействием фосфатной группы АМР с Arg-309, влияет на положение петли, в состав которой входят остатки Phe-285 и Phe-286, расположенные вблизи активного центра. Изменение конформации в этом участ-

же молекулы может включать небольшие перемещения боковых цепей аминокислот в области активного центра, обеспечивающие появление каталитической активности и увеличение сродства к субстрату.

При рентгеноструктурном исследовании фосфорилазы *b* не удалось локализовать первые 19 аминокислотных остатков с N-конца молекулы, среди которых находится Ser-14, фосфорилируемый киназой фосфорилазы. Этот факт говорит о значительной подвижности рассматриваемого участка. В структуре же фосфорилазы *a* остатки 8—19 занимают фиксированное положение; фосфатная группа Ser-14 взаимодействует с Arg-69 на внешней стороне спирали AA' и с боковой цепью Arg-43 соседней субъединицы. В N-концевой части молекулы около Ser-14 находятся четыре основные аминокислоты (Lys и Arg); поэтому при переходе фермента из формы *a* в форму *b* N-концевая часть как бы отталкивается от кластера аргининовых остатков, локализованных в участке узнавания серилфосфата.

В молекуле фосфорилазы *a* серилфосфат находится на расстоянии около 1,5 нм от участка связывания АМР и на расстоянии ~3,5 нм от каталитического центра. АМР и серилфосфат взаимодействуют с аминокислотными остатками спирали AA'. Это позволяет предполагать, что механизмы происходящего при связывании АМР и при фосфорилировании перехода фермента из неактивной формы в активную имеют сходные черты. Детали этого процесса пока остаются неясными. Поскольку участок фосфорилирования доступен для киназы фосфорилазы и протеинфосфатазы-1, очевидно, что он локализован на поверхности молекулы фермента; аналогичная ситуация, вероятно, имеет место и у других обратимо модифицируемых ферментов.

Многие современные представления о природе кооперативных эффектов сформировались на основе исследования гемоглобина. Хорошо известно, что этот белок имеет структуру $\alpha_2\beta_2$, т. е. построен из субъединиц двух типов; каждая субъединица ($M_r = 16\,000$) содержит одну гемовую группу. Атом железа гема связывает одну молекулу O_2 , так что при полной ок-

сигенации гемоглобин содержит четыре молекулы O_2 . Третичные структуры окси- и дезоксигемоглобина сходны, однако существуют и определенные различия. Показано, что при связывании O_2 происходит перемещение атома железа в плоскость кольца гема. Это вызывает изменения в структуре субъединиц и их взаимной ориентации, поскольку атом железа в субъединицах обоих типов эффективно взаимодействует с определенным остатком гистидина [5, 6].

Свыше 60 лет назад было установлено, что зависимость степени оксигенации гемоглобина от парциального давления O_2 описывается кривой, имеющей четко выраженный сигмоидный характер. Возможно, такой вид графика обусловлен трудностью связывания первой молекулы O_2 с любой из четырех групп гема и последующим более легким связыванием остальных молекул O_2 . Принимая во внимание, что группы гема расположены далеко друг от друга, что их прямое взаимодействие невозможно и что конформации окси- и дезоксигемоглобина различны, можно полагать, что затруднение при связывании первой молекулы O_2 обусловлено особенностями конформации молекулы дезоксигемоглобина.

Это представление легло в основу двух математических моделей, которые позволяют объяснить сигмоидные эффекты при функционировании белков и ферментов. Их детальное описание читатель может найти в оригинальных статьях [7, 8], а также в двух прекрасных обзорах [9, 10].

Согласно модели Кошланда [7] связывание O_2 с первой субъединицей индуцирует в ней структурное изменение, которое передается на соседнюю субъединицу через контактную зону. Индуцированное во второй субъединице структурное изменение обеспечивает более легкое связывание кислорода. Образование комплекса со второй молекулой O_2 в свою очередь влияет на конформацию третьей субъединицы и т. д.

Модель Моно [8] предполагает, что в равновесии молекулы гемоглобина находятся в двух конформационных состояниях: «напряженном», или Т-состоянии, характеризующемся низким сродством к O_2 , и «релак-

сированном», или R-состоянии, с высоким сродством к O_2 . В отсутствие O_2 преобладает T-состояние. Добавление O_2 , который преимущественно связывается с гемоглобином в R-состоянии, сдвигает равновесие в сторону этого состояния и тем самым провоцирует появление большого числа участков, обладающих высоким сродством к O_2 . Сочетание двух факторов: а) функционирования нескольких участков связывания O_2 и б) сдвига равновесия между T- и R-состояниями белка — обуславливает сигмоидную зависимость степени оксигенации гемоглобина от парциального давления O_2 .

Рентгеноструктурное исследование гемоглобина не позволяет сделать выбор в пользу одной из двух приведенных моделей. В процессе кристаллизации молекулы белка «замораживаются» в определенной конфигурации, поэтому установить их конформацию при частичном насыщении кислородом не удается [6].

Модели Моно и Кошланда отличаются тем, что, согласно первой, белок находится в виде смеси двух конформационных состояний (в отсутствие O_2) и переход из T- в R-состояние осуществляется согласованно, т. е. конформация всех субъединиц изменяется одновременно; согласно второй модели, конформационные изменения происходят последовательно, через ряд промежуточных состояний. Однако обе модели предусматривают, что белок обладает определенными структурными особенностями. Он может находиться по крайней мере в двух конформационных состояниях, должен иметь несколько участков связывания O_2 (и, следовательно, несколько субъединиц) и при введении в систему кислорода переходит в форму, обладающую большим сродством к O_2 .

Приведенное качественное описание моделей показывает, что механизмы, обуславливающие сигмоидный характер кривых насыщения белка лигандом, весьма сходны с механизмами аллостерических переходов. Связывание O_2 в одном участке влияет на его связывание в другом, пространственно удаленном участке, подобно тому, как это происходит в случае ингибирования АТФазы при действии СТР (или при активации

сАМР-ПК в присутствии сАМР (гл. 4). Кривая оксигенации гемоглобина аналогична сигмоидным кривым, характеризующим зависимость активности некоторых ферментов от концентрации субстрата (рис. 2.4 и 2.11). Действие многих аллостерических эффекторов можно довольно просто объяснить на основании описанных выше моделей. Согласно модели Моно, аллостерический ингибитор смещает равновесие в сторону Т-состояния и тем самым сдвигает сигмоидную кривую «вправо», что еще больше увеличивает ее сигмоидность [примером может служить влияние аланина на пируваткиназу (см. гл. 4)]. Наоборот, аллостерический активатор, стимулирующий переход фермента в R-состояние, сдвигает сигмоидную кривую влево; при этом она приближается по форме к гиперболе (например, в случае действия валина на треониндеаминазу, рис. 2.4, или Фр1,6Ф на пируваткиназу, гл. 4).

Определить экспериментально, какая из моделей (согласованная или последовательная) лучше описывает поведение фермента, часто оказывается нелегко, тем более что фермент может претерпевать аллостерические переходы обоих типов. Например, показано, что сигмоидный характер зависимости активности АТКазы от концентрации аспартата (рис. 2.11) хорошо объясняется согласованным конформационным переходом субъединиц, в то время как ингибирование ее активности под действием СТР (рис. 2.11) лучше объясняется последовательным изменением конформации субъединиц [1]. Таким образом, взаимодействия между каталитическими субъединицами и между каталитическими и регуляторными субъединицами осуществляются с помощью различных молекулярных механизмов.

Важно подчеркнуть, что, хотя большинство внутриклеточных ферментов — это олигомеры, построенные из двух или более субъединиц, лишь очень немногие из них функционируют согласно кинетике сигмоидного характера или регулируются аллостерическими эффекторами. Это можно проиллюстрировать на примере ферментов, катализирующих превращение гликогена и глюкозы в молочную кислоту в мышцах

Таблица 6.1. Свойства гликолитических ферментов из мышц млекопитающих¹⁾

Фермент	Мол. масса субъединицы $\times 10^{-3}$	Число субъединиц	Аллостерическая регуляция
Гексокиназа	96	1	Есть (Г6Ф ⁻)
Фосфорилаза	100	2	» (АМР ⁺ , АТР ⁻ , Г6Ф ⁻)
α -1,6-глюкозидаза	160	1	Нет
Фосфоглюкомутаза	62	1	»
Фосфогексоизомераза	65	2	»
Фосфофруктокиназа ²⁾	85	4	Есть (P _i ⁺ , АМР ⁺ , Фр2, 6Ф ⁺ АТР ⁻ , цитрат ⁻)
Альдолаза	40	4	Нет
Триозофосфатизомераза	26	2	»
Г3Ф-дегидрогеназа	36	4	»
Фосфоглицераткиназа	45	1	»
Фосфоглицератмутаза	26	2	»
Энолаза	41	4	»
Пируваткиназа ³⁾	57	4	»
Лактатдегидрогеназа	35	4	»

¹⁾ (+) активатор, (-) ингибитор, Г3Ф — глицеральдегид-3-фосфат.

²⁾ См. [12].

³⁾ Пируваткиназа является регуляторным ферментом в печени (гл. 4), но не в мышце.

млекопитающих (табл. 6.1): 10 из 14 ферментов образованы двумя или более субъединицами, однако только у двух ферментов обнаружена сигмоидная кинетика и аллостерическая регуляция. Более того, один из четырех мономерных ферментов (гексокиназа) регулируется аллостерическим эффектором (Г6Ф). Г6Ф является неконкурентным ингибитором по отношению к глюкозе и конкурентным ингибитором по отношению ко второму субстрату — АТР [11]. Кинетика действия данного фермента не описывается сигмоидной кривой, и аллостерические переходы в этом случае должны осуществляться в пределах одной субъединицы, подобно тому как это происходит при превращении химотрипсиногена в химотрипсин. Эти данные показывают,

что при аллостерической регуляции активности фермента не обязательно должен наблюдаться сигмоидный характер кинетических кривых.

Следует также отметить, что сигмоидную кинетику можно объяснить не только на основе моделей Кошланда и Моно; предложены и другие модели, которые не предусматривают наличия у фермента нескольких участков связывания субстрата [10]. Способы регуляции активности ферментов столь различны, что представляется вполне возможным функционирование различных механизмов, приводящих к сигмоидным эффектам; можно ожидать, что экспериментальные доказательства функционирования различных теоретически возможных механизмов будут получены в дальнейших исследованиях.

Как отмечалось в гл. 2, сигмоидная кинетика обеспечивает большую чувствительность активности фермента к концентрации субстрата или эффектора (в определенном диапазоне концентраций). Следует, однако, отметить, что *in vivo* сигмоидные эффекты выявлены только для одного белка — гемоглобина; это оказалось возможным благодаря тому, что в интактных эритроцитах легко наблюдать характерные спектральные изменения, сопровождающие оксигенацию.

Заключительные замечания

В настоящее время благодаря исследованию очищенных белков расшифрованы механизмы регуляции активности многих ферментов. Основная задача данной книги — показать многообразие этих механизмов, обсудить трудности, с которыми встречается экспериментатор при выяснении физиологического значения процессов регуляции. По нашему мнению, гораздо более важно, например, решить вопрос, действительно ли АМР активирует фосфоорилазу в мышечных клетках, чем обсуждать применимость той или иной теоретической модели для описания сигмоидной зависимости активности фермента от концентрации АМР. Однако в ряде учебников биохимии основное внимание уделяется именно рассмотрению теоретических моделей,

тогда как другие аспекты регуляции активности ферментов остаются в тени. Поэтому я надеюсь, что предлагаемая вниманию читателей книга окажется для них полезной.

Литература

1. *Kantrowitz E. R., Pastra-Landis S. C., Lipscomb W. N.* Trends in Biochemical Sciences, 5, 124—128 (1980).
2. *Weber I. T., Johnson L. N., Wilson K. S., Yeates D. G. R., Wild D. L., Jenkins J. A.* Nature, 274, 433—437 (1978).
3. *Fletterick R. J., Madsen N. B.* Ann. Rev. Biochem., 49, 31—61 (1980).
4. *Jenkins J. A., Johnson L. N., Stuart D. I., Stura E. A., Wilson K. A., Zonotti G.* Phil. Trans. R. Soc. London B, 293, 23—41 (1981).
5. *Perutz M. F.* Nature, 228, 726—734 237, 495—499 (1970).
6. *Benesch R., Benesch R. E., Bauer C.* In: The Red. Blood Cell (D. Surgenor, ed.), Academic Press, London and New York, pp. 825—839, 1975.
7. *Koshland D. E., Nemethy G., Filmer D.* Biochemistry, 5, 365—385 (1966).
8. *Monod J., Wyman J., Changeux J. P.* J. Mol. Biol., 12, 88—118 (1965).
9. *Koshland D. W.* Curr. Top. Cell. Reg., 1, 1—27 (1969).
10. *Newsholme E. A., Start C.* Regulation in Metabolism, Chapter 2, John Wiley and Sons, London, 1973.
11. *Colowick S. P.* In: The Enzymes IX (3rd ed.) (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, London, pp. 1—14, 1973.
12. *Hers H. G., Van Schaftingen E.* Biochem. J., 206, 1—12 (1982).

Оглавление

144

От переводчика	5
1. Введение	7
Литература	8
2. Регуляция биосинтеза аминокислот и нуклеотидов у бактерий путем ингибирования конечным продуктом	9
2.1. Регуляция биосинтеза L-изолейцина	10
2.2. Утрата чувствительности треониндеаминазы к L-изолейцину; аллостерическая теория	12
2.3. Регуляция активности L-треониндеаминазы in vivo	14
2.4. Регуляция биосинтеза L-лизина, L-метионина, L-треонина и L-изолейцина	15
2.5. Изоферменты аспартаткиназы у <i>E. coli</i> K-12, обладающие различными регуляторными свойствами	16
2.6. Бифункциональный фермент аспартаткиназа—гомосериндегидрогеназа; полифункциональные ферменты и полиферментные комплексы	19
2.7. Регуляция аспартаткиназы у различных бактерий; эволюция регуляторных механизмов	23
2.8. Регуляция биосинтеза пиримидинов у <i>E. coli</i>	24
2.9. Структура АТКазы: индивидуальные каталитические и регуляторные субъединицы в одном ферменте	29
2.10. Заключение	31
Литература	32
3. Появление биологической активности в результате ограниченного протеолиза	34
3.1. Активация зимогенов в тонком кишечнике	34
3.2. Молекулярные основы свертывания крови	46
3.3. Активация системы комплемента	54
3.4. Заключение	57
Литература	58
4. Регуляция ферментов путем обратимого фосфорилирования: нервная и гормональная регуляция клеточной активности	61
4.1. Метаболизм гликогена в скелетной мышце	62
4.2. Открытие регуляции ферментов путем обратимого фосфорилирования	62
4.3. Регуляция мышечного сокращения	63
4.4. Синхронизация гликогенолиза и мышечного сокращения: активация киназы фосфорилазы ионами кальция, кальмодулином и тропонином	66
4.5. Роль субстратов и аллостерических эффекторов в регуляции гликогенолиза	71
4.6. Регуляция гликогенолиза адреналином	75
4.7. Регуляция синтеза гликогена	80
4.8. cAMP и действие гормонов	85
4.9. Кальмодулин и регуляция функции клеток	94
4.10. Синхронизация метаболических путей при действии нервных и гормональных стимулов	98
4.11. Механизм действия инсулина	100
4.12. Заключение	102
Литература	104
5. Регуляция ферментативной активности путем ковалентной модификации, отличной от ограниченного протеолиза и фосфорилирования	108
5.1. Регуляция активности глутаминсинтетазы <i>E. coli</i> путем аденилирования и уридилрования	108
5.2. Регуляция активности цитратлиазы в анаэробных бактериях путем ацетилирования—деацетилирования	118
5.3. Активация светом ферментов хлоропластов путем тиол—дисульфидного превращения	121
5.4. NAD ⁺ -зависимые реакции ADP-рибозилирования	124
5.5. Заключение	131
Литература	132
6. Природа аллостерических эффектов	135
Заключительные замечания	142
Литература	143